
MASTERARBEIT

Frau
Katrin Zerbe

**Messung mikrorheologischer
Eigenschaften von
biologischen Proben mit
Hochgeschwindigkeits-
Fluoreszenz-Videomikroskopie**

2017

MASTERARBEIT

Messung mikrorheologischer Eigenschaften von biologischen Proben mit Hochgeschwindigkeits- Fluoreszenz-Videomikroskopie

Autorin:

Katrin Zerbe

Studiengang:

Physikalische Technik: Medizintechnik

Seminargruppe:

LT15w1-M

Erstprüfer:

Prof. Dr. rer. nat. habil. Alexander Horn

Zweitprüfer:

Prof. Dr.-Ing. Ben Fabry

Mittweida, 2017

Bibliografische Angaben

Zerbe, Katrin: Messung mikrorheologischer Eigenschaften von biologischen Proben mit Hochgeschwindigkeits-Fluoreszenz-Videomikroskopie, 73 Seiten, 46 Abbildungen, 14 Tabellen, Hochschule Mittweida, University of Applied Sciences, Fakultät Ingenieurwissenschaften

Masterarbeit, 2017

Referat

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Implementierung einer neuen Untersuchungsmethode für Viskositätseigenschaften von medizinischen Flüssigkeiten. Eine Bestimmung mikrorheologischer Eigenschaften von biologischen Proben minimaler Volumina wird mit einem Hochgeschwindigkeits-Fluoreszenz-Videomikroskop durch Tracken der Brownschen Bewegung von Beads in der zu messenden Flüssigkeit umgesetzt. Der Versuchsaufbau ist vor allem durch das geringe Probenvolumen geeignet für den medizinischen Einsatz. Neben der Entwicklung eines Probenträgers werden synthetische Tränen und echte Tränen von Probanden untersucht.

I. Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	II
Tabellenverzeichnis	III
Abkürzungsverzeichnis	IV
1 Einleitung	1
2 Grundlagen	3
2.1 Mikrorheologie	3
2.2 Medizinischer Hintergrund	3
2.3 Brownsche Molekularbewegung	6
2.4 Hochgeschwindigkeits-Fluoreszenz-Videomikroskopie	8
2.5 Experimenteller Aufbau	9
2.6 Kamera	12
2.7 Rauschen	13
3 Methoden	15
3.1 Materialien	15
3.2 Bestimmung der Kamera- und Bildeigenschaften	17
3.2.1 Bildrate	17
3.2.2 Bildrauschen	18
3.2.3 Linearität des CMOS-Sensors	19
3.2.4 Auflösungsvermögen	19
3.3 Messung und Auswertung	20
3.3.1 Messung	20
3.3.2 Auswertung	21
3.4 Synthetische Tränen	22
3.5 Tränenflüssigkeit und ihre Viskosität	23
3.5.1 Proben-Gewinnung und Präparation	23
3.5.2 Probenkonservierung und Viskositätsmessungen von Tränenflüssigkeit	24
4 Ergebnisse und zusammenfassende Diskussion	27
4.1 Bestimmung der Kamera- und Bildeigenschaften	27
4.1.1 Bildrate	27
4.1.2 Bildrauschen	30
4.1.3 Linearität des CMOS-Sensors	33
4.1.4 Auflösungsvermögen	34
4.2 Messung und Auswertung	35
4.2.1 Messgenauigkeit	40
4.3 Synthetische Tränen	43

4.4	Tränenflüssigkeit und ihre Viskosität	46
4.4.1	Proben-Gewinnung und Präparation	46
4.4.2	Probenkonservierung und Viskositätsmessungen von Tränenflüssigkeit	49
4.5	Zusammenfassende Diskussion	59
4.5.1	Messaufbau und Messgenauigkeit	60
4.5.2	Tränenflüssigkeit	62
5	Zusammenfassung und Ausblick	64
	Literaturverzeichnis	67
	Anhang	69

II. Abbildungsverzeichnis

1	Schematische Darstellung des Tränenfilms am menschlichen Auge	4
2	Brownsche Molekularbewegung eines Beads.	6
3	Jablonski Diagramm Fluoreszenz	8
4	Charakteristisches Spektrum	9
5	Fluoreszenzmikroskop mit verbesserten Sicherheitsaspekten	10
6	Aufbau Fluoreszenz-Video-Mikroskop	11
7	Aufbau Fluoreszenzmikroskop mit unterschiedlichen Probenaufnahmen	11
8	Präparation einer Wasserprobe mit Fluoreszenzbeads	16
9	Kalibrationsprobe	19
10	Synthetische Tränen	22
11	Probenentnahme "normale Träne"	23
12	Bildrate in Abhängigkeit von ROI	28
13	Ergebnisse der Bildrate in Abhängigkeit von ROI Größe	29
14	Ergebnisse der Bildrate in Abhängigkeit von der ROI Position	29
15	Untersuchungsergebniss systematisches Rauschen	30
16	Messergebnis des Rauschen beim Tracking	31
17	Messergebnis Wärmedrift	32
18	Messergebnis der Intensitätsuntersuchung einer Fläche von 20 px x 20 px	33
19	Messergebnis der Intensitätsuntersuchung einer Fläche von 100 px x 100 px mit einer Abweichung <7%	34
20	Pixelgrößenbestimmung	35
21	Wasser-Probe mit Beads im Hellfeld	36
22	Wasser-Probe mit Fluoreszenzbeads ohne Brightfield Beleuchtung	36
23	Größe bzw. Flächenbestimmung der Beads	37
24	Größe bzw. Flächenbestimmung des "Best Bead"	38
25	Auswahl des "Best Bead" und setzen der ROI	38
26	Schematische Beadverfolgung in der ROI (100 px x 100 px)	39
27	Histogramm einer Wasseruntersuchung	40

28	MSD mit Fit-Funktion über die ersten 10 MSD-Werte und Zufallsbewegung	41
29	MSD mit Fit-Funktion ohne den ersten MSD-Wert und Zufallsbewegung	41
30	Ergebnisse von Viskositätsmessungen von Wasser	42
31	Viskositätswerte von Cartionormmessungen	44
32	Viskosität von Bepanthen-Augentropfen	45
33	Untersuchung der Flüssigkeit in der Kapillare bezüglich ihrer Aufbewahrungszeit . . .	46
34	Viewer-Bild einer Tränen-Probe	47
35	Einfluss der Präparation "Reflexträne" von Proband 5, großer Frame	48
36	Vergleich frischer Tränen von Proband 3	51
37	Vergleich "Reflextränen" zu "normale Tränen" von Proband 5	51
38	Vergleich frischer "Reflextränen" von Proband 3	52
39	Vergleich frischer "Reflextränen" von Proband 1	53
40	Vergleich frischer "Reflextränen" von Proband 2	53
41	Aufnahme einer Tränen-Probe im großen Frame	54
42	Aufnahme einer Tränen-Probe im kleinen Frame	55
43	Langzeitmessung "normalen Träne" von Proband 5, großer Frame	55
44	Langzeitmessung "normalen Träne" von Proband 4, kleiner Frame	56
45	Untersuchung Probanden	58
46	Reproduzierbarkeit "Reflexträne" von Proband 5, kleiner Frame	59

III. Tabellenverzeichnis

1	Einteilung der Erkrankung Trockenes Auge	5
2	Risikofaktoren für das Trockene Auge	5
3	Eigenschaften sCMOS	12
4	Kühlung CMOS	13
5	Viskosität der synthetischen Träne	22
6	Probanden	23
7	Zusammenfassung der charakteristischen Abfragebedingungen	37
8	Viskositätsmesswerte von Wasser	43
9	Resultate synthetische Träne	44
10	Proben-Volumen	47
11	Gegenüberstellung frische vs. alte Träne	49
12	Gegenüberstellung gefrorene zu frischer Träne 2	50
13	Proband 3	57
14	Reflexträne Proband 5	58

IV. Abkürzungsverzeichnis

η	dynamische Viskosität, Seite 3
$\langle x^2 \rangle$	mittlere quadratische Verschiebung, Seite 7
μ	Mittelwert, Seite 13
ν	kinematische Viskosität, Seite 3
ϕ	Fluidität, Seite 3
ρ	Dichte, Seite 3
σ_{Auslese}	Ausleserauschen, Seite 14
σ_{Gesamt}	Gesamtrauschen, Seite 14
σ_{photon}	Photonen-Rauschen, Seite 13
σ_{therm}	thermisches Rauschen, Seite 13
k_B	Boltzmann-Konstante, Seite 7
CCD	charge-coupled device, Seite 12
CMOS	Complementary metal-oxide-semiconductor, Seite 12
D	Diffusionskonstante, Seite 7
g	Verstärkungsfaktor, Seite 14
m	Masse, Seite 7
R	Radius, Seite 7
ROI	Region of Interest, Seite 17
T	Temperatur, Seite 7
t	Zeit, Seite 13
TFBUT	Tear film breakup time, Seite 6
v	Geschwindigkeit, Seite 7
x	Ort, Seite 7

1 Einleitung

Neue Ansätze in der Diagnostik von Krankheitsbildern werden zumeist durch technische Entwicklungen eröffnet. Die Technik steht daher in dynamischer Wechselwirkung mit der Medizin und macht die Implementierung und Untersuchung von neuen Konzepten, Strategien und Methoden notwendig.

Für die Forschung und Untersuchung geringster Probenmengen bestehen derzeit nur begrenzte Möglichkeiten. Aus diesem Grund bedarf es neuer Methodenansätze und Weiterentwicklungen bereits bestehender Technik. Gerade im medizinischen Bereich sind Proben nicht in unbegrenzter Menge vorhanden, wie beispielsweise Tränenflüssigkeit, die vor allem beim Krankheitsbild des sogenannten "trockenen Auges" von großer Wichtigkeit ist.

Diese Arbeit befasst sich daher mit der Entwicklung einer Untersuchungsmethode von Flüssigkeiten im μl -Bereich und einem neuen medizinischen Diagnoseansatz für das "trockene Auge".

Das "trockene Auge" ist durch facettenreiche Symptome geprägt und führt unbehandelt zu Beschwerden oder sogar zu Sehstörungen. Je nach Herkunft und Altersstufe sind 2 %- 28 % der Bevölkerung von dieser Krankheit betroffen. Derzeit existiert für die Diagnose noch kein Goldstandard. Für eine eindeutige Diagnose werden mehrere verschiedene Tests durchgeführt. Dazu gehören je nach Ausstattung beispielsweise die Messung der Tränenabrisszeit, der Schirmerstreifentest und die Untersuchung mit der Spaltlampe. Jede Untersuchung beginnt mit einer vollständigen Anamnese, da Variablen wie Ort, Tagesabhängigkeit, die Belastung am Arbeitsplatz sowie allgemeine Erkrankungen wie Infektionen eine Rolle spielen. Daher sind nicht ausschließlich Umweltfaktoren, wie Bildschirmarbeit oder Klimaanlage, verantwortlich. Allgemein kann dies an einer zu geringen Flüssigkeitsmenge, einer zu geringen Viskosität oder einer zu hohen Oberflächenspannung liegen. Das Krankheitsbild wird derzeit differenziert in hyposekretorische (eingeschränkte) oder hyperevaporative (uneingeschränkte) Tränenproduktion [10].

Diese Arbeit befasst sich neben der technischen Entwicklung mit einem neuen medizinischen Ansatz als mögliche Ursache für das Krankheitsbild. Dieser liegt in einer niedrigeren Viskosität, welche ihren Ursprung in der veränderten Zusammensetzung bzw. Konzentration der Bestandteile der Träne wie z.B. Muzine und Proteine findet. Eine Untersuchung des Einflusses des Trockene Auge-Syndroms auf die Tränenviskosität soll Aufschluss geben, ob eine zu geringe Viskosität Auslöser eines vorzeitigen Abriss des Tränenfilms auf der Augenoberfläche ist [10].

Der Ansatz zur Viskositätsbestimmung bezieht sich auf die Beobachtung der Brown-schen Molekularbewegung von fluoreszenten Beads. Diese werden der Flüssigkeit beigemischt und sind intensiv fluoreszierende, sphärische Perlen bestimmter Größe bestehend aus einem amorphen Polymer [20]. Die Aufzeichnung der Beadtrajektorien mittels Fluoreszenzmikroskopie ermöglicht die Bestimmung der Viskosität der zu untersuchenden Flüssigkeit.

Zielsetzung dieser Arbeit ist die Implementierung eines Verfahrens zur Untersuchung mikrorheologischer Probeneigenschaften mit Hilfe eines Hochgeschwindigkeits-Fluoreszenz-Videomikroskops. In Zusammenarbeit mit einer physikalischen Masterarbeit (Herr Michael Hlavatsch, B.Sc) und einer medizinischen Doktorarbeit (Frau Martina Braun) werden Tränen des ungereizten ("normale Tränen") und die Tränen des gereizten Auges ("Reflextränen") auf ihre Viskosität und zeitliche Veränderung untersucht.

Die Eckpunkte dieser Arbeit sind:

- Optimierung des Versuchsaufbaus.
- Überprüfung der Eigenschaften von Bauteilen und des gesamten Messaufbaus.
- Erstellung von Programmen zur Messung der Fluoreszenzbead-Bewegungen und Auswertung der dabei erhaltenen Daten.
- Überprüfung der Messgenauigkeit und Reproduzierbarkeit der Daten.
- Erste Viskositätsuntersuchungen von biologischen Proben bzw. Untersuchung unterschiedlicher Tränenflüssigkeiten.
- Vergleich von Präparationsmöglichkeiten.

2 Grundlagen

2.1 Mikrorheologie

Die thermische Mikrorheologie dient der Untersuchung des mechanischen Verhalten von Materie. Die theoretischen Grundlagen der thermischen Mikrorheologie beruhen auf der Elastizitätstheorie, der Thermodynamik und der Strömungslehre von Fluiden. In dieser Arbeit werden biologische Proben, das heißt Materialien mit sowohl elastischem als auch viskosem Verhalten, auf ihre viskoelastischen Eigenschaften hin untersucht. Im Fokus der folgenden Untersuchungen stehen vor allem medizinische Proben, wie beispielsweise Tränenflüssigkeit oder Zellen. Durch den Einfluss dissipativer Vorgänge ist die Viskoelastizität eine dynamische Größe, die außerdem nicht nur von der Probe selbst abhängig ist, sondern auch von physikalischen Umgebungsgrößen wie: Zeit und Temperatur. In dieser Arbeit liegt das Hauptaugenmerk auf der zentralen Größe "Viskosität" und deren Bestimmung bei Flüssigkeiten. Unterschieden wird die dynamische- η und die kinematische Viskosität ν .

$$\eta = \nu \rho = \frac{1}{\phi} \quad (2.1)$$

Beide stehen in direktem Zusammenhang mit der Dichte ρ , wobei der Kehrwert der dynamischen Viskosität die Fluidität ϕ darstellt.

Die Viskosität ist eine zentrale Größe in der Rheologie und ein Maß für die innere Reibung. Je stärker die Teilchen aneinander gebunden sind, desto unbeweglicher sind sie und daraus folgt: Je größer die Viskosität der Flüssigkeit, desto "zähflüssiger" das Verhalten.

Ebenso ist die Viskosität eine zentrale physikalische Eigenschaft von Tränen und künstlichen Tränen, die für die Benetzung der wasserabweisenden Hornhaut zuständig sind. Die Viskosität der Tränenflüssigkeit steht im direkten Zusammenhang mit der Tränenabrisszeit. Eine Beeinträchtigung der Tränenqualität durch unphysiologisches Benetzungs- und Fließverhalten kann zu einer reduzierten Funktion des Auges führen.

2.2 Medizinischer Hintergrund

Das Hauptziel dieser Masterarbeit liegt in der Realisierung einer Möglichkeit zur Viskositätsmessung von medizinischen Proben. Bisherige Messmethoden, wie beispielsweise das Fallviskosimeter, erfordern relativ große Probenmengen (Milliliter). Bei biologischen

oder medizinischen Anwendungen stehen oft nur begrenzte Probenvolumina zur Verfügung (Mikroliter). Ebenso auch beim Tränenfilm des menschlichen Auges, der aus einer $2\text{ }\mu\text{m}$ - $10\text{ }\mu\text{m}$ Flüssigkeitsschicht besteht (siehe Abbildung 1).

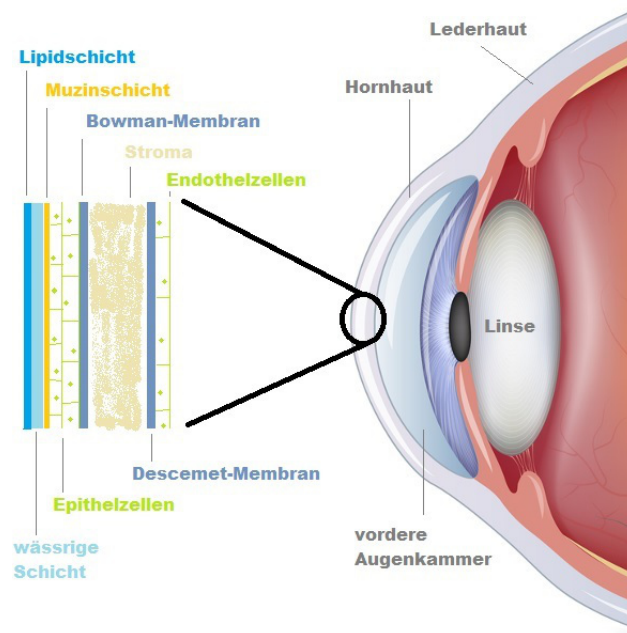


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Tränenfilms am menschlichen Auge [17].

Ist der Tränenfilm beeinträchtigt, kommt es zum Krankheitsbild des sogenannten “*Trockenen Auges -Keratoconjunctivitis sicca-*” [24]. Laut Definition ist das “Trockene Auge” eine multifaktorielle Erkrankung mit facettenreichen Symptomen, wie:

- Rötung der Augen
- Brennen
- Juckreiz
- Stechen
- Fremdkörpergefühl
- Photophobie

Die Erkrankung ist geprägt von einer erhöhten Osmolarität der Tränenflüssigkeit, d.h. die Stoffmengenkonzentration der osmotisch aktiven Teilchen der Flüssigkeit ist erhöht und führt zu Beschwerdesymptomen oder Sehstörungen [11]. Allgemein kann die Erkrankung des “Trockenen Auges” in das hyperevaporative und das hyposekretorische “Trockene Auge” differenziert werden (siehe Tabelle 1). Der Unterschied liegt in der Beeinträchtigung der Tränenproduktion. Bei der “hyperevaporativen” Erscheinung ist die Funktion der Tränendrüsen nicht beeinträchtigt und durch zumeist äußere Ursachen bedingt. Im Gegensatz dazu ist das Auftreten des Krankheitsbildes “hyposekretorisch” auf eine eingeschränkte Tränenbildung zurück zu führen.

Tabelle 1: Einteilung der Erkrankung Trockenes Auge [10]

hyperevaporative Trockene Auge	hyposekretorische Trockene Auge
-übermäßiger Wasserverlust bei normaler Tränensekretion	-Tränenflüssigkeitsmangel durch verminderte oder ausbleibende Tränensekretion
-erhöhte Tränenfilmverdunstung durch extrinsische oder intrinsische Ursachen	-durch mangelndes Tränenvolumen kommt es zum abreißen oder zur inhomogenen Verteilung des Tränenfilms

Zumeist handelt es sich um eine entzündliche Erkrankung mit chronischen Verlauf, bei der die Behandlung äußerst aufwendig und langwierig ist. In schweren Fällen kann es ohne Behandlung zu einer Tränenfilminstabilität und dadurch zur schwerwiegenden Schädigung des Auges kommen. Weitere Risikofaktoren mit einem hohen Evidenzgrad sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Tabelle 2: Risikofaktoren für das Trockene Auge [10]

Risikofaktoren:	Alter Weibliches Geschlecht Androgeninsuffizienz Vitamin-A-Mangel Einnahme von Antihistaminika Refraktive Chirurgie der Hornhaut Hämatopoetische Stammzelltransplantation Bestrahlung Hepatitis C Kollagenosen
------------------------	---

Eine weitere mögliche Ursache des trockenen Auges, welches weder mit einer zu hohen Evaporation noch mit einer zu geringen Produktionsmenge einhergehen muss, ist eine Veränderung der Zusammensetzung der Tränenflüssigkeit, so dass es zu Veränderungen der Benetzungsfähigkeit kommt. Die Benetzungsfähigkeit ist maßgeblich durch zwei physikalische Eigenschaften bestimmt: Die Oberflächenspannung und die Viskosität. Ist entweder die Oberflächenspannung zu hoch oder die Viskosität zu niedrig, wird der Tränenfilm instabil und kann vorzeitig abreißen, was anschließend die selben Krankheitssymptome verursachen kann wie Hyposekretion und Hyperevaporation [10].

Die „TFBUT“ (*Tear film breakup time*) ist eine geläufige Untersuchungsmethode um die Stabilität des Tränenfilms zu messen. Dabei wird die Dicke des Films, der das Auge umgibt, auf die Zeit bis zum Abriss untersucht wird. Im gesunden Zustand geschieht das nach ca. 10 Sekunden und ist abhängig von der Zusammensetzung der Träne bzw. ihrer Konsistenz [17]. Die Untersuchung kann nicht invasiv per Videokeratographie oder invasiv mit der fluoreszenzabhängigen TFBUT erfolgen [10].

Ein neuer medizinischer Ansatz für die Untersuchung ist die Viskositätsmessung der Tränenflüssigkeit mit minimaler Probenmenge.

Bisherige Untersuchungsmöglichkeiten wie beispielsweise mit Schirmer-Streifen führen meist zu einer unangenehmen Reizung des Auges und damit zur Tränenbildung. Im Gegensatz zur „normalen Träne“ weist die bei einer Reizung entstehende sogenannte „Reflexträne“ eine andere Zusammensetzung auf. Durch die Reizung des Auges kommt es zu einer erhöhten Drüsenproduktion und dadurch zu Unterschieden in der Proteinkonzentration sowie im Wasseranteil. Dabei stellt sich die Frage, ob die Messung der „normalen Träne“ aussagekräftiger ist, da die verdünnte „Reflexträne“ keine konstante Konzentration aufweist.

In den folgenden Untersuchungen wurde deshalb eine alternative Methode eingesetzt, um Tränenflüssigkeits-Proben von Probanden zu gewinnen. Dabei wird eine Glaskapillare an das untere Augenlid gehalten, und die Tränenflüssigkeit wird durch den Kapillareffekt in die Kapillare eingesogen (siehe Kapitel 3.5.1).

2.3 Brownsche Molekularbewegung

Die Teilchen einer Flüssigkeit befinden sich unter normalen Bedingungen niemals in Ruhe. Sie führen eine ungeordnete thermisch verursachte Bewegung aus. Diese wird als die thermische Teilchenbewegung bzw. Brownsche Molekularbewegung bezeichnet. Deren Geschwindigkeiten sind in Betrag und Richtung nach bekannten Gesetzmäßigkeiten statistisch verteilt. Dabei verursachen die Stöße der einzelnen thermisch bewegten Moleküle eine unregelmäßige Fortbewegung von größeren Teilchen, die in die Flüssigkeit eingebracht werden (siehe Abbildung 2).

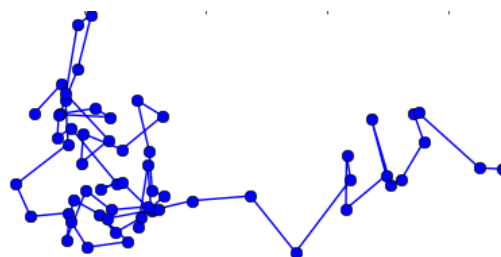


Abbildung 2: Brownsche Molekularbewegung eines Beads.

Die ungeordnete Bewegung der Moleküle wird als Wärmebewegung bezeichnet und ist die Ursache für Diffusion von Teilchen einer Flüssigkeit. Auch mesoskopische Teilchen, wie beispielsweise Fluoreszenzbeads führen die Brownsche Molekularbewegung aus. Der Teilchentransport ist abhängig von der Teilchengröße (Radius R), Viskosität η der Flüssigkeit, Masse des Teilchens m und der Umgebungstemperatur T . Nach dem Äquipartitionstheorem bei Betrachtung der XY-Ebene gilt für die potentialfreie Energieerhaltung der Teilchen [14].

$$\frac{m}{2} \bar{v}^2 = \frac{m}{2} (\bar{v}_x^2 + \bar{v}_y^2) = k_B T \quad (2.2)$$

Die hohe Frequenz der einzelnen Stöße verhindert eine direkte Teilchengeschwindigkeitsmessung, sondern erlaubt nur eine statistische Auswertung. Aus diesem Grund liegt der Ansatz im "Tracken" der Positionsänderung (Ort x) der Beads. Unter Berücksichtigung einiger Kenngrößen des Mediums und Näherungen bezüglich der Ausgangs- und der Gleichgewichtssituation gilt die Einsteinsche Formel für die Brownsche Molekularbewegung [13], [16], [19]. Sie beschreibt die Bewegung der Teilchen in der untersuchten, viskosen Flüssigkeit.

$$\langle x^2 \rangle = \frac{k_B T}{6r\pi\eta} t \quad (2.3)$$

$\langle x^2 \rangle$ ist die mittlere quadratische Verschiebung (engl. mean squared displacement (MSD)) der X- und Y-Koordinate, die das Bead auf seinem Weg, ausgehend von einem Punkt (x_0, y_0) in einer Zeit t , zurücklegt. Nach Einstein und Smoluchwski kann $\langle x^2 \rangle$

$$\langle x^2 \rangle = 4Dt \quad (2.4)$$

ebenso über den Zusammenhang der Diffusionskonstante D unter Berücksichtigung der Zeit ermittelt werden.

Die Diffusionskonstante D ist ein Maß für die Beweglichkeit der Teilchen in einem Medium und lässt sich aus dem Quadrat der Wegstrecke pro Zeit bestimmen und wird angegeben in $[m^2/s]$ [7], [19].

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta r} \quad (2.5)$$

Um im später beschriebenen Auswertungsprogramm (siehe Kapitel 3.3.2) die dynamische Viskosität η zu ermitteln, wurden die Formeln 2.4 und 2.5 verwendet. Der Fak-

tor vier berücksichtigt die Betrachtung in zwei Dimension bzw. der XY-Ebene, die der Fokusebene entspricht. Nach Umstellen der Formel zur Viskosität ergibt sich für die dynamische Viskosität.

$$\eta = \frac{k_B T 4t}{6\pi \langle x^2 \rangle r} \quad (2.6)$$

Formel 2.6 stellt die Basis für die Auswertungs-Software und die damit verbundene Berechnung der Viskosität dar.

2.4 Hochgeschwindigkeits-Fluoreszenz-Videomikroskopie

In den naturwissenschaftlichen Disziplinen ist die Fluoreszenzmikroskopie eine der am besten etablierten Untersuchungsmethoden. Von ganzen Organismen bis hin zu einzelnen Molekülen wird diese Form der Lichtmikroskopie für die Beobachtung intrazellulärer Prozesse und molekularer Wechselwirkungen verwendet [22] [23]. Dabei basiert das Prinzip auf strahlungsaussendenden Fluorochromen. Durch Absorption von Strahlung einer definierten Wellenlänge kommt es zur Anregung und dadurch zum Übergang von Elektronen in einen energiereicheren Zustand (siehe Abbildung 3 (1)). Das energiereiche Elektron im Zustand Z1' erfährt durch Vibrationen Dissipation (siehe Abbildung 3 (2)) und geht dadurch in einen energieärmeren, jedoch immer noch angeregten Zustand Z1, über. Anschließend kommt es zur Emission eines infolge der Stokes-Verschiebung langwelligeren Photons (siehe Abbildung 3 (3)). Das Elektron kehrt in den Grundzustand Z0 zurück, wobei der Prozess ca. 1 ns - 10 ns andauert [12].

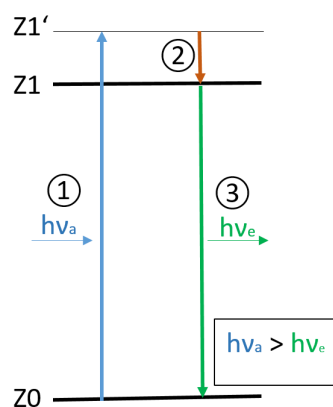


Abbildung 3: Jablonski Diagramm Fluoreszenz: (1) Absorption eines Photons definierter Wellenlänge, (2) Vibrationsverluste, (3) Emission eines Photons längerer Wellenlänge.

Die Wellenlänge der Strahlung des im Versuchsaufbau befindlichen Lasers liegt bei 532 nm und ist damit im Anregungsbereich (Intensitätsmaximum bei 540 nm) der Beads. Diese intensiv fluoreszierenden, sphärischen Perlen mit einem Durchmesser von 1 μm sind beschichtet mit Farbstoffen die kaum Photobleichung zeigen. Durch die bereits angesprochene Stokes-Verschiebung kommt es zur Emission von Strahlung größerer Wellenlänge und damit zum charakteristischen Emissionsbereich (Intensitätsmaximum bei 560 nm) der Beads (siehe Abbildung 4).

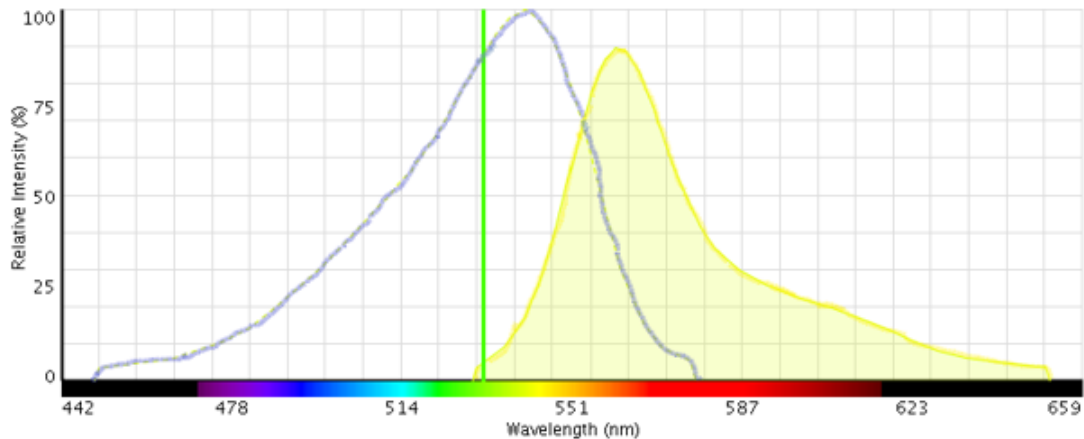


Abbildung 4: Charakteristisches Spektrum der Beads (blau: Anregungsspektren in nm; gelb: Emissionsspektren in nm) und des Lasers (grün: Wellenlänge $\lambda = 532 \text{ nm}$) [20].

2.5 Experimenteller Aufbau

Das für die hier beschriebene Messung verwendete Mikroskop ist ein im Rahmen von Abschlussarbeiten [2] entwickelter Eigenbau und befindet sich unter Laborbedingungen auf einem freistehenden, schwingungsisolierenden Tisch. Ein Druckluftanschluss ermöglicht die Tischplatte durch ein Luftkissen zu heben und Stöße, die durch Außenwirkungen auftreten, zu dämpfen. Zudem gewährleisten massiv gefertigte Bauteile und die Probenaufnahme ein vibrations- und driftarmes Positionieren und Untersuchen von Präparaten. Zu den Hauptkomponenten gehören:

- Laser, MGL-H-532 der Firma CNI (Wellenlänge $\lambda = 532 \text{ nm}$, mittlere Leistung $P_{av} = 1 \text{ Watt}$ [3])
- sCMOS-Kamera, Neo 5.5 der Firma Andor, (2560 x 2160 aktive Pixel [1])
- Probenobjektiv, (100x Apochromat 1.46 NA Öl, infinity-corrected (Nikon))

Der Aufbau wurde im Laufe der Untersuchungen bezüglich seiner Sicherheitsaspekte verbessert. Dazu wurden zusätzliche, nicht reflektierende und feuerfeste Schaumstoffplatten (Thorlabs) rund um die Probenaufnahme und das Kameraobjektiv angebracht. Einen weiteren Schutz des Bedieners vor Laserstrahlung bietet neben Laserschutzbrillen, eine schwarze Stoffbahn, die seitlich vom Bediener um den Aufbau gespannt wurde (siehe Abbildung 5).

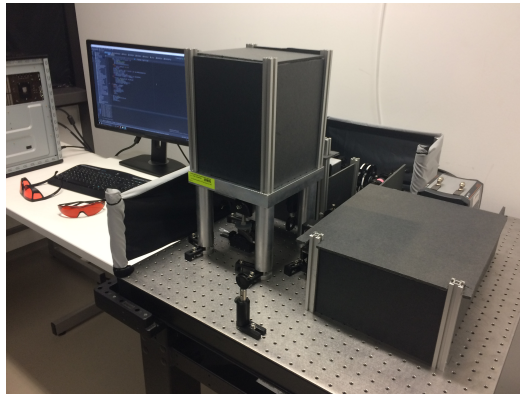


Abbildung 5: Fluoreszenzmikroskop mit verbesserten Sicherheitsaspekten. Abschirmung der Laserstrahlung durch schwarze Stoffbahnen seitlich vom Bediener. Zusätzliche feuerfeste und nichtreflektierende Schaumstoffplatten zur Abschirmung der Kamera und der Probenaufnahme­fläche vor Licht.

Die Anregung der Fluoreszenz-Beads erfolgt mit Laserstrahlung, wobei diese über optische Elemente zu den Hauptkomponenten geführt wird [23]. Diese sind beispielsweise Linsen (siehe Abbildung 6, 5), 6), 7)), Filter (siehe (3), 11)) und dichroitische Spiegel (8)). Die Kombination der optischen Elemente und damit einhergehenden Stellmöglichkeiten erleichtern die Gestaltung der Strahlform bzw. eine vollständige Ausleuchtung des Objektives. Zudem bietet der Spiegel (Komponente 9)) die Möglichkeit der Interferenz Totalreflexionsfluoreszenzmikroskopie (TIRF). Allgemein verläuft der Strahlengang über den Tisch hin zur Probenaufnahme und anschließend zur Kamerabox, in der sich die Kamera befindet. Die dadurch gewährleistete zusätzliche Abdunklung der Kamera und Dämmen des Laborlichtes hat eine zusätzliche Verbesserung der Kontrast- und Rauscheigenschaften des Bildes zur Folge [2].

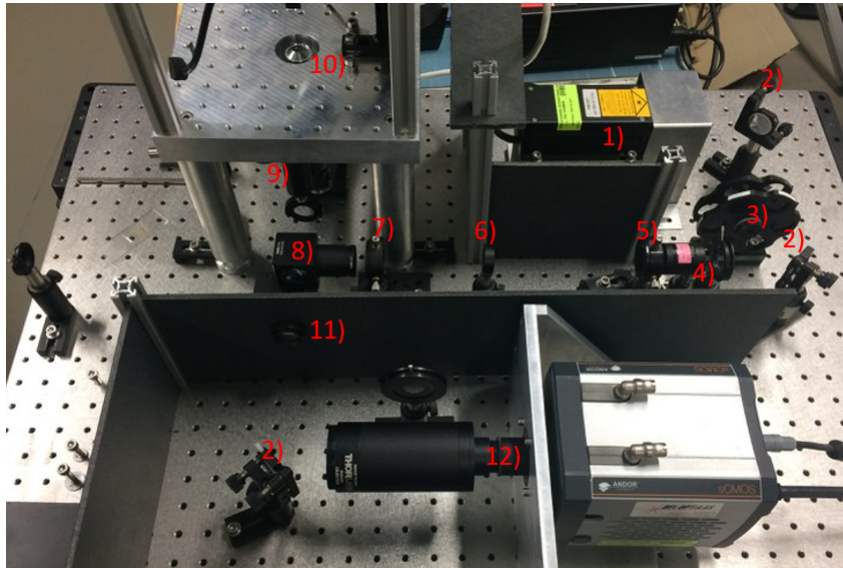


Abbildung 6: Aufbau Fluoreszenz-Video-Mikroskop: 1) Laser, 2) Spiegel, 3) Filter, 4) Lochblende, 5) und 6) Linsen, 7) Lochblende, 8) dichroitischer Spiegel, 9) Spiegel, 10) Objektiv, 11) Bandpssfilter, 12) Kamera mit Tubuslinse.

Die untersuchten Proben liegen in unterschiedlichen Probenträgern, wie z.b. Objektträger (Slides) oder Schälchen, vor. Für Standardslides, wie sie in dieser Arbeit eingesetzt werden, ist die Probenpositionierung von Hand auf dem Mikroskoptisch am besten geeignet (siehe Abbildung 7(a)). Für eine verbesserte Untersuchungsmöglichkeit anderer Probenträger wurde im späteren Verlauf eine vorhandene XY-Stage umgebaut und so gestaltet, dass sie ohne großen Aufwand in den Messaufbau integriert werden kann (siehe Abbildung 7(b)).

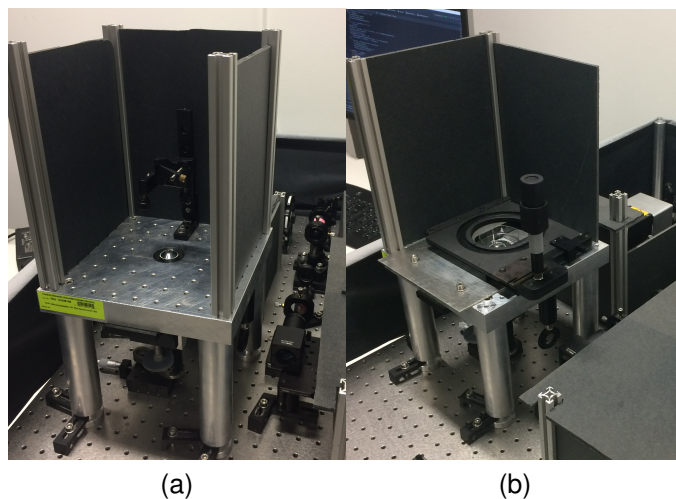


Abbildung 7: Aufbau Fluoreszenzmikroskop mit unterschiedlichen Probenaufnahmen (a) Standard Aufbau, (b) Aufbau mit XY-Stage.

2.6 Kamera

Die Kamera sCMOS Neo 5.5 der Firma Andor ist eine Hochleistungskamera für den wissenschaftlichen Einsatz und bildet das Herzstück des Aufbaus. Möglichkeiten zur Kühlung sorgen für eine Verbesserung der Bildqualität bei längerem Einsatz. Von Vorteil ist die hohe Dynamik von 30.000:1 und Geschwindigkeiten von bis zu 30 Bildern pro Sekunde im Vollbild [1]. Die Nutzung des Bildausschnittes (ROI) erhöht die erreichbare Bildrate zusätzlich [2].

Ein weiterer Vorteil stellt zudem die hohe Datenverarbeitungsfähigkeit bzw. Auslesegeschwindigkeit von 560 MHz und ein 4 GB Pufferspeicher dar. Dieser erlaubt im späteren Programm eine schnelle Aufnahme bei gleichzeitiger Verarbeitung der Bilder. Die eigentliche Messung erfolgt durch einen auf CMOS-Technik basierenden Halbleiterdetektor. Der sogenannte Active-Pixel-Sensor ermöglicht eine Bildaufnahme mit 2560 x 2160 aktiven Pixeln und eine hohe Bildrate bei gleichzeitig sehr geringem Ausleserauschen [1]. Im späteren Einsatz wird die Möglichkeit der Ansteuerung einzelner Pixel genutzt, da ein Setzen bzw. Auslesen von kleineren definierten Bereichen (ROI) weniger Auslesezeit benötigt. Das erhöht ebenso die damit verbundene Bildrate.

CMOS-Sensoren weisen durch technische Weiterentwicklungen, wie beispielsweise Mikrolinsenarrays bezüglich ihrer Empfindlichkeit vergleichbare Eigenschaften (siehe Tabelle 3) zu den bislang üblichen CCD-Sensoren auf. CMOS-Sensoren erreichen durch ihren Aufbau und interne Einstellungsoptionen eine hohe Bildrate. Die CMOS-Technologie hat gegenüber der CCD-Technik den Vorteil, dass Effekte wie "Blooming" und "Smearing" in geringerem Maße auftreten: Detektiert ein Pixel eine zu hohe Intensität, d.h. wird die maximal speicherbare Anzahl an Elektronen pro Pixel überschritten, werden benachbarte Pixel dadurch beeinflusst (das sog. Blooming und Bleeding). Ebenfalls kann der Transport von Ladungen bereits, belichteter Pixel ein Streifenmuster (Smearing) verursachen [8]. Die hier verwendete Kamera bietet neben einer hohen Auflösung und exzellenten Rauscheigenschaften eine gute Full-Well-Kapazität, also eine hohe Anzahl an Ladungsträger (30 000) pro Pixel [6].

Tabelle 3: Eigenschaften sCMOS [1]

Parameter	sCMOS
Aktive Pixel	2560 x 2160 (5.5 Megapixel)
Sensorgröße	16.6 mm x 14 mm (21.8 mm diagonal)
Pixelgröße	6.5 μm
Maximale Kühlung	- 40°C
Maximale Ausleserate (Vollbild)	560 MHz
Maximale Bildrate	Sustained: 30 fps full frame Burst: 100 fps full frame
Auslesemodus	Rolling und Global

2.7 Rauschen

Rauschen definiert das Auflösungsvermögen und kann in systematisches und statistisches Rauschen unterteilt werden. Beispiele für systematisches Rauschen sind das Auftreten von Mustern oder einzelner Pixel, die heller oder dunkler im Ausgabebild erscheinen. Die Abweichung der Pixelintensitäten kann die Genauigkeit des “Tracking” herabsetzen. Eine Korrekturmöglichkeit bieten die Hellfeld- und die Dunkelfeld-Korrektur.

Zum statistischen Rauschen zählt beispielsweise das Ausleserauschen und das Schrot-rauschen. In dieser Arbeit werden die drei relevanten Störfaktoren Photonen-Rauschen σ_{photon} , thermisches Rauschen σ_{therm} und Ausleserauschen σ_{Auslese} im Vorfeld untersucht [4], [9].

Allgemein entsteht Schrotrauschen bei einem stochastischen und stationären Prozess, der aus diskreten und unabhängigen Ereignissen besteht, beispielsweise dem Eintreffen von Photonen aus einer nicht-kohärenten Strahlungsquelle auf den Pixel-Sensor. Betrachtet wird eine bestimmte Wahrscheinlichkeit, dass im Zeitraum $(t, t+1)$ ein Ereignis (Eintreffen eines Photons) eintritt. Die Wahrscheinlichkeitsverteilung ist Poissonverteilt und tritt als Photonen-Rauschen σ_{photon} auf. Dabei ist das Verhältnis von Streuung σ_{photon}^2 (Anzahl der Photonen bei wiederholten Messungen mit gleicher Belichtungsdauer) zu Mittelwert μ (der eintreffenden Photonen) konstant.

$$\frac{\sigma_{\text{photon}}^2}{\mu} = 1 \quad (2.7)$$

Die Wahrscheinlichkeitsverteilung des thermischen Rauschens σ_{therm} des Bildsensors ist ebenso Poissonverteilt und spielt eine große Rolle bei sehr langen Belichtungszeiten, etwa in der Astronomie. Das thermische Rauschen ist allerdings erst ab Belichtungszeiten von über 10 s - 100 s maßgeblich, infolge des Dunkelstromes, für das Gesamt-rauschen mit verantwortlich. Der Dunkelstrom wird hervorgerufen von freien Ladungsträgern, die auf Grund von thermischer Einwirkung im Halbleiter des Photodetektors gebildet werden. Einzelne Pixel mit besonders hohem Dunkelstrom werden als “Hotpixel” bezeichnet. Die thermische Beeinflussung führt zu einer Potentialerhöhung und damit zu einem ungewollten Anregen und Verschieben der Elektronen in das Valenzband. Das thermische Rauschen wird durch die Möglichkeit der Kamerakühlung auf ein vernachlässigbares Rauschminimum gesenkt.

Tabelle 4: Kühlung CMOS [1]

Kühltemperatur [°C]	Kühlmöglichkeit	Dunkelstrom [$e^- / \text{pix} / \text{sec}$]
-20	Luftkühlung	0.015
-40	Wasserkühlung	0.007

Unter Berücksichtigung der Quantenausbeute - bei der vorliegenden Kamera von 65% bei Strahlung der Wellenlänge von 500 nm - verringert sich das mittlere Signal und das Rauschen, wobei Gl. 2.7 unverändert gilt.

Das Ausleserauschen σ_{Auslese} entsteht durch die Verstärkung und Analog-zu-Digitalwandlung der vom Sensor detektierten Elektronen. Die Anzahl der detektierten Elektronen wird nicht direkt ausgegeben, sondern mit einem Verstärkungsfaktor g in ein digitales Signal umgewandelt. Dadurch ergibt sich für das Verhältnis von Streuung zu Mittelwert:

$$\frac{\sigma_{\text{Auslese}}^2}{\mu} = g \quad (2.8)$$

Das Gesamtrauschen setzt sich folglich aus allen drei von einander unabhängigen Rauscharten zusammen.

$$\sigma_{\text{Gesamt}}^2 = (g\sigma_{\text{photon}}^2) + \sigma_{\text{Auslese}}^2 + (g\sigma_{\text{therm}}^2) \quad (2.9)$$

Wobei das thermische, sowie das Photonenrauschen vom Ausleseverstärker mit dem Faktor g verstärkt wird [5].

3 Methoden

3.1 Materialien

Die verwendeten Proben variieren je nach behandelte Fragestellung von einfachem Wasser hin zu komplexen biologischen Materialien und Zellen. Die anfänglichen Messungen dienen hauptsächlich der Kalibration des Aufbaus und der Softwareanpassung. Hierzu sind einfache und langlebige Proben geeignet. Aus diesem Grund wird anhand des Protokolls "*Materialvorbereitung zur Viskositätsmessung*" (siehe Anhang) eine Standard Probe für Viskositätsmessungen hergestellt. Die Standardprobe zur Kalibration des Messaufbaus setzt sich zusammen aus einem definierten Volumen von destilliertem Wasser ($9,5\ \mu\text{l}$) und gevortexten Beads ($0,5\ \mu\text{l}$) (Invitrogen F8820) (siehe Abbildung 8 (a)).

Das Anmischen der fluoreszenzbehafteten amorphen Polymer-Perlen (Beads) erfolgt nicht bei jeder Probenträgerpräparation erneut. Das Beadvolumen wird einer Stammlösung entnommen, die abgedunkelt und gekühlt längere Zeit (ca. einen Monat) aufbewahrt werden kann.

Zur Vorbereitung der Stammlösung werden $50\ \mu\text{l}$ Beads einer dreimaligen Waschprozedur unterzogen. Die Beads werden mit $100\ \mu\text{l}$ Wasser verdünnt und zentrifugiert. Anschließend wird annähernd das gesamte Wasser mit einer Pipette entfernt und der Vorgang weitere zwei mal wiederholt. Nach anschließenden 15 s andauernden sonifizieren sind die Beads vereinzelt und gut in der wässrigen Lösung verteilt. Das Mischen der Flüssigkeit mit den Beads erfolgt ebenfalls mit Pipetten in einem Eppendorf-Behälter (siehe Abbildung 8(a)). Die Probe wird mittig eines Gene Frame bzw. großem Frame (Fischer Scientific AB-0576) (siehe Abbildung 8(b) blauer Rahmen) auf einen Objektträger gegeben. Der innere Ausschnitt des Frames ist $10\ \text{mm} \times 10\ \text{mm}$ und fasst ein Volumen von $25\ \mu\text{l}$. Die Probe wird anschließend mit einem Deckglas verschlossen.

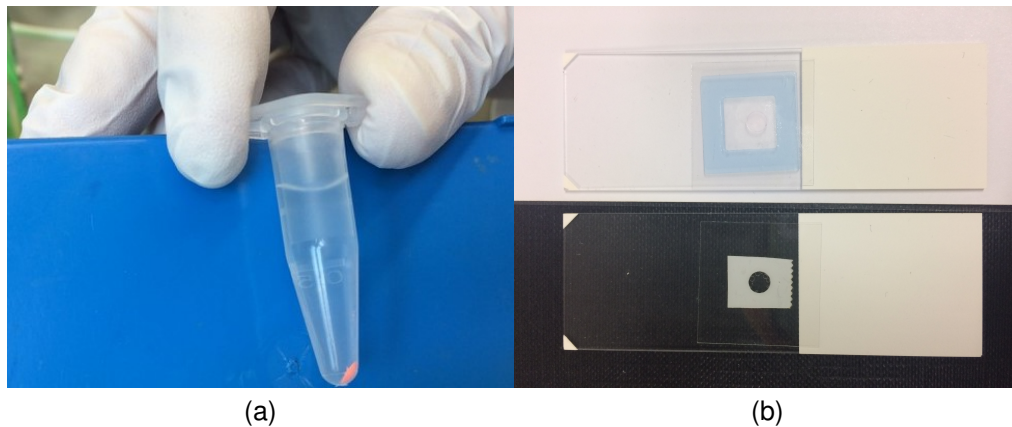


Abbildung 8: Präparation einer Wasserprobe mit Fluoreszenzbeads (a) Beads in wässriger Lösung im Eppendorf-Behälter, (b) Fertig präparierter Probenträger mit großem Frame (oben) und kleinem Frame (unten).

Bezogen auf die mikroskopisch bedingte geringe Eindringtiefe in das Präparat, wird ein $170 \pm 5 \mu\text{m}$ starkes Deckglas (LH 24.1) zum Verschließen des Präparates verwendet. Das Glas hat die Abmaße 22 mm x 22 mm und wird direkt auf den selbstklebenden Gene Frame aufgebracht (siehe Abbildung 8 (b)) und unter leichtem Druck luftdicht verschlossen.

Im späteren Verlauf der Arbeit werden die Proben mit selbst entwickelten Frames präpariert, um ein geringeres Luftvolumen zwischen Frame und Träne zu erhalten. Sie werden aus doppelseitigem Klebeband hergestellt. Mit Hilfe eines Skalpells wird ein ca. 10 mm x 10 mm großes Stück zurecht geschnitten. In der Mitte der Fläche wird ein Loch zur Probenaufnahme mit einem Durchmesser von 4 mm eingestanz. Das entstandene Volumen beträgt $2,2 \mu\text{l}$ (siehe Abbildung 8(b) unten). Das verwendete Probenvolumen beträgt bei diesem Frame nur $2 \mu\text{l}$, wobei die Anmischung weiterhin im Verhältnis $4 \mu\text{l}$ Fluid + $0,2 \mu\text{l}$ Beads erfolgt.

Der Frame wird ebenfalls luftdicht mit einem runden Deckglas (Durchmesser 15 mm), oder den bereits beschriebenen LH 24.1 Deckgläsern, verschlossen.

3.2 Bestimmung der Kamera- und Bildeigenschaften

Die Viskosität ist, wie in Kapitel 2 beschrieben, von Zeit und Temperatur abhängig. Daher spielt die Frequenz beim "Tracking" der beigemischten Fluorochrome und die damit verbundene Bildaufnahme eine große Rolle. Aus diesem Grund besteht die Notwendigkeit in

- einer hohen Bildrate bei möglichst hoher Auflösung, und geringer Belichtungszeit
- einer hohen Dynamik für große Helligkeitsunterschiede innerhalb eines Bildes bei der Untersuchung der Beadbewegung.
- einer höheren Empfindlichkeit und geringerem Ausleserauschen.

Daher werden im ersten Schritt alle zur Verfügung stehenden und mit der Software manuell einstellbaren Kameraeigenschaften aufgelistet und kritisch auf ihre Einstellungsmöglichkeiten und Optionen untersucht (siehe Anhang "Ausgabe Kameraeigenschaften") und bewertet. Dabei ermöglicht das Zusammenspiel von *Python* und dem *Micro-manager* ein einfaches Umschalten zwischen den Eigenschaften bzw. Kameramodi.

3.2.1 Bildrate

Nach der geeigneten Auswahl verschiedener Kameraoptionen folgt die Bestimmung der Bildrate in Abhängigkeit von der dargestellten Bildgröße und -position eines kleineren und definierten Bildausschnittes (ROI) (Region of Interest). Ziel ist es im Vorfeld die geeignetste Größe der ROI mit gleichzeitig schnellster Bildrate zu ermitteln. Zudem soll der Einfluss der Position des gesetzten Bildausschnitts auf die Bildrate untersucht werden. Die Umsetzung erfolgt ebenfalls mit Hilfe eines zusätzlichen Programmes. Die Messungen werden bei den Shuttereinstellung "Global" und "Rolling" wiederholt. Diese Optionen beschreiben ein unterschiedliches Belichtungs- und Ausleseverhalten des CMOS-Sensors. Global bedeutet ein vollständiges Inaktivieren des Sensors während des Ausleseprozesses. Wohingegen die Rollingfunktion ein gleichzeitiges Belichten und Auslesen jeweils unterschiedlicher Sensorbereiche und damit eine höhere Bildrate ermöglicht.

Zu erwarten ist, dass unter der Verwendung des Global Shutter eine sichtliche Reduzierung von Bewegungs-Artefakten erfolgt, die unter Umständen bei Rolling Shutter auftreten können.

Laut Hersteller beträgt die Bildrate ca. 30 Frames (Bildern) pro Sekunde bei Verwendung des vollen Kamerabildes. Durch setzen einer ROI soll eine Bildrate von nahezu 500 fps erzielt werden.

3.2.2 Bildrauschen

Um die Rauscheigenschaften der Kamera zu ermitteln, wird eine analytische Betrachtung der aufgenommenen Kamerabilder durchgeführt. Im Folgenden wird ein Bildausschnitt (ROI) von 100 px x 100 px mittig im Kamerabild untersucht. Das Rauschen selbst ist, wie bereits im Kapitel 2.7 angesprochen, eine additive Zusammensetzung aus systematischen und zufälligen Fehlern. Hilfsmittel bzw. Kameratools, wie beispielsweise Filter oder eine geringere Ausleserate, ermöglichen eine Reduzierung des systematischen Fehlers (siehe Kapitel 4.1). Angenommen wird, dass diese Hilfsmittel und die Möglichkeit der Kamerakühlung auf bis zu -30 °C den Gesamtrauschwert ausreichend klein halten. Ebenfalls wird das Grundrauschen durch Abziehen eines im Vorfeld aufgenommenen Bildes reduziert, welches aus dem Mittelwert von 1000 nacheinander aufgenommenen Dunkelbildern erstellt wird. Diese sogenannte Dunkelfeld-Korrektur bewirkt eine Reduzierung des systematischen Musters.

Bestimmung des Rauschlevels bei der Bestimmung der Beadposition

Die Rauschlevelbestimmung erfolgt durch "Tracken" eines Fluoreszenzbeads, das sich im vollständigen Stillstand befindet. Hierzu dienen eingetrocknete Proben, die noch leuchtende Beads aufweisen und durch die Austrocknung nicht mehr beweglich sind. Eine Messung mit dem "Tracking"-Programm nimmt einzeln 200 mal ein Bead, welches sich in der Fokusebene befindet, für 1000 Zeitschritte auf. Anschließend folgt eine Bestimmung der mittleren quadratischen Verschiebung des Beadschwerpunktes. Die Position des stillstehenden Beads sollte zu jedem Punkt gleich sein. Aus diesem Grund gibt die Standardabweichung dieser Werte Aufschluss auf die Genauigkeit des "Tracking".

Bei genauerer Betrachtung der Beadtajektorien ist jedoch außerdem ein Drift festzustellen. Um diesen Drift vom Positionsrauschen der Beadbestimmung zu trennen, wird die Standardabweichung der Differenz zwischen zwei jeweils aufeinanderfolgenden Beadpositionen verwendet. Da sich dabei die Varianzen von je zwei Messungen addieren, muss die so berechnete Standardabweichung noch um den Faktor $\sqrt{2}$ korrigiert werden.

$$\langle \Delta x \rangle_{rms} = \frac{\sqrt{\langle \Delta x \rangle^2}}{\sqrt{2}} \quad (3.1)$$

Thermisches Rauschen (thermischer Drift)

Zur Feststellung des Fehlers, der sich durch äußere thermische Einwirkungen ergibt, werden ebenfalls ausgetrocknete bzw. still stehende Beads getrackt und ausgewertet. Vor der Messung erfolgt eine kurzzeitige Wärmezufuhr auf den Objektisch, der zur Probenaufnahme dient. Dazu werden zwei Behältnisse mit 100 ml heißer Flüssigkeit (ca. 100 °C) direkt neben der Probe für 3 min positioniert. Beim entfernen der Wärmequellen wird zeitgleich die Messung gestartet und die XY-Position des betrachteten Fluores-

zenzbeads aufgenommen. Ein durch die thermische Einwirkung bedingter Drift müsste sich in einer nachvollziehbaren Positionsänderung äußern.

3.2.3 Linearität des CMOS-Sensors

Ein Qualitätsmerkmal eines CMOS-Sensors ist die Linearität und die gleichmäßige Empfindlichkeit der einzelnen Pixel. Die Sensitivität der Pixel kann unterschiedlich sein und somit vereinzelt zu Hot- bzw. Darkpixeln führen. Diese können das Bild, insbesondere die Messgenauigkeit der Beadposition, negativ beeinflussen. Zur Überprüfung eines gleichmäßigen Verhaltens der einzelnen Pixel, werden mehrere Flat-field Versuchsbilder bei verschiedenen Umgebungshelligkeiten aufgenommen und die minimal- und maximal Intensitäten ermittelt. Dazu wurde eine regelbare Lichtquelle vor der Kamera positioniert. Anschließend folgte die Bestimmung der Intensität aller einzelnen Pixel in Abhängigkeit der mittleren Pixelintensität des gesamten Bildes.

3.2.4 Auflösungsvermögen

Die Pixelgröße ist relevant für die späteren Berechnungen und muss im Vorfeld der Viskositätsbestimmung ausreichend genau ermittelt werden. Diese konstante Größe wird für die Umrechnung von Pixel in μm benötigt. Damit wird die Verschiebung des Beads in μm bestimmt. Aus dieser wird im späteren Programm die Diffusionskonstante und damit die Viskosität berechnet (siehe Formeln 2.5 und 2.6). Für die Ermittlung des Auflösungsvermögens wird eine handelsübliche Kalibrationsprobe verwendet (siehe Abbildung 9).

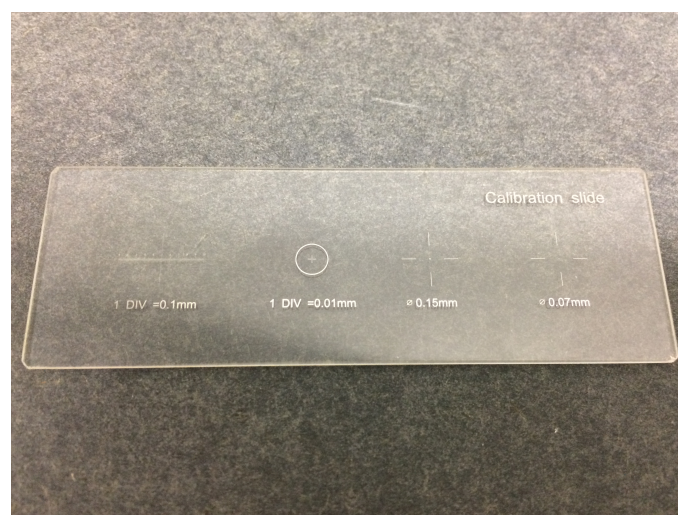


Abbildung 9: Kalibrationsprobe mit Geometrien verschiedener Größe und definierten Abständen für die Kalibrierung und die Bestimmung der Kameraeigenschaften.

Diese speziell dafür vorgesehene Kalibrationsprobe weist mehrere Geometrien in diversen Größenordnungen und definierten Abständen bzw. Skalen auf. Verwendet wird ein

100x Objektiv und die 0,01 mm Geometrie. Die Bestimmung des Auflösungsvermögens erfolgt durch die Aufnahme eines Bildes im Hellfeld und anschließender Auswertung mit einem Bildbearbeitungsprogramm.

3.3 Messung und Auswertung

Die Untersuchung hat das Ziel, eine Viskositätsmessung mit gleichzeitiger Echtzeitverfolgung umzusetzen. Über Tracken der Beadpositionen werden die gemittelten Teilstrecken (MSD-Werte $\langle x^2(t) \rangle$), also die Strecke welche das Bead im Mittel zu einer bestimmten Zeit zurücklegt, ermittelt. Die Software für die Viskositätsbestimmung wird unterteilt in Messung und Auswertung.

3.3.1 Messung

Die Software zum Messen ist in Python implementiert und nutzt die Schnittstelle des MicroManagers, um auf die Kamera zu zugreifen. Die eigentliche Messung beinhaltet zwei Aspekte:

- 1) Der **“LiveViewer”** ermöglicht während der Messung eine visuelle Verfolgung der Beads im Probeninneren. Die Umsetzung erfolgt über ein Anzeigefenster und ermöglicht eine gleichzeitige Überwachung und Verfolgung des Präparates sowie der Fokusebene. Zudem enthält die Bedieneroberfläche eine Schaltfläche bzw. ein Bedienelement zum Einleiten und Stoppen der Messung. Die Speicherung der Daten erfolgt automatisch in Form einer Liste, wobei der Speicherort bzw. Pfad vor Beginn der Messung durch einen Button “select Folder“ ausgewählt werden kann.
- 2) **“Tracker”** In diesem Teil des Programmes soll ein möglichst schnelles Tracken der Beads umgesetzt werden. Ein Ziel ist die in den Vorversuchen ermittelte Bildrate von 481 fps zu erreichen. Im ersten Schritt wird das gesamte Kamerabild, das vom Viewer gezeigt wird, auf das Vorhandensein von verwertbaren Beads in der Fokusebene untersucht. Die Auswahl des besten Beads erfolgt über mehrere charakteristische Abfragen. Zunächst wird das ganze Kamerabild auf lokale Intensitätsmaxima mit einem globalen Schwellenwert untersucht. Nur Intensitäten oberhalb des angegebenen Wertes werden berücksichtigt. Im folgenden werden alle zusammenhängenden Regionen, die oberhalb des Schwellenwertes liegen, ausgewertet. Dies geschieht über die `regionprops` Funktion des `skimage` Paketes, das zu jeder zusammenhängenden Region verschiedene Eigenschaften, wie z.B. Fläche, Exzentrizität, etc, errechnet. Das heißt, es wird abgewogen, ob es sich bei der Detektierung um ein Bead handelt. Dies geschieht über die Fläche der detektierten Region. Liegt sie zwischen 25 px^2 und 300 px^2 , wird davon ausgegangen, dass es ein Bead ist. Von diesen Beads wird jenes mit der maximalen

Intensität verwendet. Um dieses "Best-Bead" wird eine ROI für die weitere Aufnahme gesetzt. Das Bead bildet dabei den Mittelpunkt der ROI. Die gewählte ROI hat eine Größe von 100 px x 100 px. Diese Größe ermöglicht die hohe Bildrate von ca. 500 fps. Mit dieser Bildrate werden 1000 Bilder pro Bead aufgenommen und im Arbeitsspeicher abgelegt. Nach der Aufnahme wird in jedem dieser Bilder die Beadposition detektiert und die jeweilige Position aufgelistet, um daraus später im Auswertungsprogramm die MSD-Werte zu bestimmen. Die Ermittlung der Beadposition geschieht über die Berechnung des Intensitätsschwerpunktes (Center of Mass bzw. Center of Gravity) der Beadregion. Die Beadregion ist dabei der Bereich, der über dem gewählten Helligkeitsschwellenwert liegt. Gibt es mehrere solcher Bereiche oder berührt der Bereich den Rand, wird das "Tracking" abgebrochen. Abschließend wird eine Liste mit den XY-Positionen, der Beadnummer, der Bildrate, sowie einem Zeitstempel erstellt, abgespeichert und bildet die Grundlage für das Auswertungsprogramm. Zusammengefasst werden pro Messung 200 Beads für jeweils 1000 Zeitschritte getrackt und die Werte gelistet. Diese Werte sind für jede Untersuchung manuell einstellbar. Gleichzeitig erfolgt eine Ausgabe der Kamertemperatur bei jedem Trackingvorgang [15].

3.3.2 Auswertung

Die Auswertung erfolgt durch ein mit Python erstelltes Programm. Dieses wurde im Rahmen einer weiteren Masterarbeit von Herrn Michael Hlavatsch B.Sc. programmiert. Zu Beginn liest das Auswertungsprogramm "Evaluation Programm" die vom "Viewer-Tracker" erstellte Liste ein. Das Programm verwendet die XY-Parameter der getrackten Beads und die dazugehörigen Zeitstempel. Mit Hilfe der Gleichungen 2.5 und 2.6 (siehe Kapitel 2) wird die Diffusionskonstante, sowie der Viskositätswert bestimmt und ausgegeben. Weitere Konstanten, wie die Boltzmannkonstante, Pixelgröße, Bead-Durchmesser und die Labortemperatur werden im Programm manuell eingegeben. Für eine optimale visuelle Einschätzung der Qualität der jeweiligen Messung werden zwei Diagramme erstellt. Zum einen wird die mittlere quadratische Abweichung $\langle x^2(t) \rangle$ in Abhängigkeit der Zeit aufgetragen und zum anderen die Trajektorie des Teilchens abgebildet. Die Viskositätswerte der einzelnen Beads werden zusätzlich in einer separaten Liste erstellt und gespeichert. Aus vielen Einzelbead-Messungen wird am Ende der geometrische Mittelwert der Viskosität und der dazugehörige Fehler ($\bar{\eta} \pm \Delta \eta$) bestimmt.

Die Überprüfung der Messgenauigkeit sowie die Funktionalität des Auswertungsprogrammes erfolgt zunächst durch die Bestimmung der allgemein bekannten Viskosität von Wasser (Viskosität $\eta_{\text{Wasser}} = 0,89 \text{ mPa s}$ (bei 25°C) [21]). Die Präparation der Probe erfolgt anhand des Protokolls (Materialvorbereitung zur Viskositätsmessung) mit $9,5 \mu\text{l}$ Wasser gemischt mit $0,5 \mu\text{l}$ Beads. Ein mehrmaliges Messen verschiedener Präparate dient der Bestimmung bzw. Überprüfung der Reproduzierbarkeit. Die Messungen werden mit beiden zur Verfügung stehenden Frame-Varianten durchgeführt.

3.4 Synthetische Tränen

Die Behandlung von Augenkrankheiten bzw. trockener Augen erfolgt oft mit Hilfe von sogenannten künstlichen Tränen bzw. Augentropfen. Diese dienen der Benetzung trockener, gereizter Augen und stabilisieren den natürlichen Tränenfilm. Eine kleine Auswahl verschiedener Augentropfen werden als Vergleichsproben vermessen und ausgewertet. Dazu wurden die folgenden 5 Medikamente ausgewählt (siehe Tabelle 5 und Abbildung 10).

Tabelle 5: Viskosität der synthetischen Träne

Nr.	Name	Viskositätsangabe vom Hersteller	Verpackung
1	Herba-Vision	mittel-hoch	Flasche
2	Cationorm	niedrig	Flasche
3	Systane	mittel-hoch	Flasche
4	EvoTears	niedrig	Flasche
5	Bepanthen	keine Angabe	Eindosenbehältnisse

Die Präparation der Proben erfolgt gleich der normalen Träne, d.h. mit 4 μl Träne und 0,2 μl Beads. Die Handhabung, Präparation und der Messablauf unterscheidet sich nicht von der regulären Tränenviskositätsmessung.



Abbildung 10: Synthetische Tränen; Diverse Augentropfen: Bepanthen (einzeln verpackt); Systane (Flasche); EvoTears (Flasche); Cartionorm (Flasche) und Herba-Vision (Flasche).

Zudem dient ein wiederholtes Messen der Proben Cartionorm und Bepanthen der Überprüfung der Reproduzierbarkeit.

3.5 Tränenflüssigkeit und ihre Viskosität

Für die Untersuchungen wurden fünf Probanden ausgewählt (siehe Tabelle 6). Dabei wurde darauf geachtet, dass es sich um drei gesunde Personen und zwei mit trockenen Augen handelt. Dies dient einer besseren Vergleichbarkeit der Werte. Untersucht werden "normale Tränen" sowie "Reflexränen".

Tabelle 6: Probanden

Nummer Proband	Status
1	gesundes Auge
2	trockenes Auge
3	gesundes Auge
4	gesundes Auge
5	trockenes Auge

3.5.1 Proben-Gewinnung und Präparation

Die Tränenflüssigkeit kann ohne weiteres mit Beads versetzt und mit Hilfe des Hochgeschwindigkeits-Fluoreszenz-Videomikroskops getrackt werden. Die Herausforderung besteht im geringen Probenvolumen bei der Gewinnung einer "normalen Träne". Dazu wird ein Kapillargefäß (siehe Abbildung 11 (Länge 32 mm, Gesamtvolumen 2 μ l, [18])) auf den Tränenfilm am unteren Auge gesetzt. Die Tränenflüssigkeit wird durch die Kapillarwirkung ins Innere der Glas-Kapillare gezogen und fasst ein Volumen von 2 μ l. Jedem Probanden wird pro Auge je eine Kapillare gefüllt und anschließend die Tränenflüssigkeit beider Augen gemischt. Die Träne wird mit Hilfe einer Gummipipette aus der Kapillare in den Deckel eines Eppendorfgefäßes gegeben und dort durch Pipetten mit Beads vermischt. Anschließend wird der erhaltene Tropfen, wie in Abschnitt 3.1 beschrieben, präpariert.



Abbildung 11: Probenentnahme "normale Träne". Zur Entnahme der Träne wird unter sterilen Bedingungen eine Glaskapillare im unteren Winkel des Auges direkt auf den Tränenfilm gesetzt. Die Kapillarwirkung bewirkt ein Füllen des Glasgefäßes.

Die "Reflexträne" wird durch Reizen des Auges gewonnen. Die Probanden werden dazu den Ausdünstungen einer aufgeschnittenen Zwiebel ausgesetzt. Beim Einsetzen der vermehrten Tränenproduktion wird ebenfalls eine Kapillare am unteren Augenwinkel angesetzt und die Träne entnommen. Die dabei verwendete Glas-Kapillare hat eine Länge von 41 mm und fasst ein Volumen von 10 μl [18].

Die anschließenden Messungen dienen der Untersuchung, wie groß der Einfluss der Präparation auf das Messergebnis ist. Dazu werden von Proband 5 größere Mengen "Reflextränen" abgenommen. Die gewonnenen Tränen werden auf zwei Volumina aufgeteilt und auf unterschiedliche Arten präpariert. Zum einen wird das gesamte zur Verfügung stehende Volumen mit Beads angereichert und kurz vor der Messung auf den Probenträger gegeben, verschlossen und vermessen. Zum anderen werden der noch reinen Tränenflüssigkeit das Volumen (4 μl) für jede Probe einzeln entnommen und präpariert.

3.5.2 Probenkonservierung und Viskositätsmessungen von Tränenflüssigkeit

Die Zeit von der Entnahme der Träne durch medizinisches Personal bis zum Vermessen im Labor ist variabel. In späteren Untersuchungen wird eine Richtzeit ermittelt, wie lange eine Träne als Präparat verwendet werden kann, um aussagekräftige Resultate bringen zu können. Daher werden zusätzliche Konservierungsmöglichkeiten, wie beispielsweise Einfrieren oder Kühlen der Tränenflüssigkeit, untersucht und in Betracht gezogen.

Folgende Fragestellungen wurden untersucht:

Frische vs. alte Träne

Zunächst wird untersucht, ob sich die Viskositätswerte einer älteren Probe von denen einer frischen Probe unterscheiden. Dazu werden Proband 1 vier Kapillaren "normalen Tränen" (2x links + 2x rechts) entnommen. Eine Probe (1x links + 1x rechts) wird, wie im Kapitel 3.1 beschrieben, präpariert und direkt gemessen. Die zweite Träne (1x links + 1x rechts) verbleibt in den Kapillaren in einem Eppendorf-Behälter bei Raumtemperatur für 3,5 h.

Frische vs. gefrorene Träne

Im nächsten Versuch werden drei Proben (insgesamt sechs Kapillare; 3x links und 3x rechts) von Proband 5 abgenommen. Probe Nr. 1 (1x links + 1x rechts) wird direkt präpariert und vermessen. Die erhaltenen Daten werden mit dem Auswertungsprogramm (siehe Kapitel 3.3.2) ausgewertet und dienen als Referenz. Probe Nr. 2 wird direkt nach der Entnahme präpariert, dh. mit Fluoreszenzbeads angemischt, auf einen Probenrä-

ger gegeben, mit einem Deckglas verschlossen und eingefroren. Probe Nr. 3 hingegen wird nach der Entnahme in den Glaskapillaren eingefroren. Falls die Daten einer temporär gefrorenen Probe aussagekräftig genug sind, könnte die Verwendung dieser Methode eine spätere Praxisanwendung erleichtern. Eingefroren sind die Proben länger haltbar und können problemlos transportiert werden.

Reflex- vs. normale Träne

Im nächsten Schritt werden die Messungen bezüglich des Unterschiedes zwischen “Reflextränen” und “normalen Tränen” durchgeführt. Unterschiedliche Viskositäten könnten auf eine unterschiedliche Proteinkonzentration zurückgeführt werden, da mit zunehmender Proteinkonzentration die Viskosität steigt. Bei einer “Reflexträne” ist neben der Reizung auch von Nachteil, dass die Zusammensetzung der Probe nicht gesteuert werden kann. Ein Vorteil der “Reflexträne” ist die erhaltene Probenmenge, die deutlich höher ist als bei der “normalen Träne”. Neben normalen Tagesform- abhängigen Schwankungen sind bei der “normalen Träne” höhere Viskositätswerte zu erwarten und wäre daher von höherer diagnostischer Aussagekraft zu einer verdünnten “Reflexträne”.

Linkes vs. rechtes Auge

Wiederholt werden “Reflextränen” des linken Auges eines Probanden vermessen. Anschließend erfolgt die Analyse der Tränen des rechten Auges. Die daraus resultierenden Werte werden mit der gemischten Träne verglichen. Diese Untersuchungen werden mit einem gefrorenen und einem frischen Satz durchgeführt.

Für eine erhöhte Aussagekraft der Messung werden die Untersuchungen bei insgesamt drei Probanden wiederholt.

Langzeitmessung

Das Wasserpräparat kann nach dem Anmischen mehrere Tage bis zu Wochen verwendet werden. Im Gegensatz dazu zeigten vorhergehende Projekte [2], dass die Träne nur kurzzeitig, d.h. für ca. zwei Stunden verwendbar ist. Nach dieser Zeit kommt es aus unbekannten Gründen zu einer merklich verminderten Beadbewegung. Aus diesem Grund wird die Änderung der Viskosität in Abhängigkeit der Zeit untersucht. Dazu werden verschiedene Langzeitmessungen durchgeführt. Die Beadanzahl der Tracks wird von 200 Beads der Standardmessung auf 1200 Beads erhöht und mit dem “ViewerTracker” Programm untersucht.

Vermutet wird, dass es auf Grund von Muzinen zum Gelieren der Flüssigkeit kommt oder eine Polymerisation der Proteine die Verringerung der Beadbewegung bewirkt [24]. Ebenfalls ist diese Bewegung durch das Sedimentieren der Beads am unteren Glas, bedingt durch die Schwerkraft, beeinträchtigt. Das Sedimentieren bzw. Verklumpen der Beads führt zu einer gegenseitigen Beeinflussung, d.h. die Messgenauigkeit ist negativ beeinflusst.

Das Luftvolumen um die Träne innerhalb des großen Frames ermöglicht eine Kondensatbildung. Das Verdunsten von Wasser aus der Träne kann eine Erhöhung der Konzen-

tration der gelösten Stoffe (Muzine, Proteine) in der Träne bewirken. Dies kann ebenfalls ein möglicher Grund einer sich zeitlich immer weiter verringerten Beadbewegung sein. Aus diesem Grund werden die Langzeitmessungen mit beiden Framearten wiederholt, da der kleine Frame mit dem kleinen Volumen ein Verdunsten und damit eine Konzentrationsänderung verhindern sollte.

Tagesabhängigkeit

Die ersten Probemessungen zeigten bereits, dass die Tageszeit bei der Probenentnahme einen Einfluss auf die Viskosität der Probe hat. Um diesbezüglich eine systematische tageszeit-abhängige (circadiane) Schwankung zu untersuchen, werden an drei Tagen mindestens fünf Proben einer "normalen Träne" des gleichen Proband abgenommen und gemessen. Die Messung ist relativ zeitaufwendig, da neben der Probenentnahme die Präparation im Labor unter sterilen Bedingungen stattfinden muss. Die Änderung der Träne in dieser Zeit kann leider nicht untersucht bzw. berücksichtigt werden. Die Messzeit beträgt ca. eine Stunde, wobei die eigentliche Präparationszeit ca. zehn Minuten dauert.

Reproduzierbarkeit

Festgestellt wurde, dass das Kühlen der Tränen ohne Beadanreicherung die Verwendungszeit verlängert. Einmal gewonnene "Reflextränen" können gekühlt über einen ganzen Tag verwendet werden. Die abschließende Untersuchung dienten erneut der Überprüfung der Reproduzierbarkeit. Dazu wurden Proband 5 größere Mengen "Reflextränen" (ca. 40 μ l) zu Beginn eines Tages abgenommen. Die Proben werden jeweils direkt vor der Messung präpariert und die Tränenflüssigkeit zwischenzeitlich in Eiswasser gelagert.

4 Ergebnisse und zusammenfassende Diskussion

4.1 Bestimmung der Kamera- und Bildeigenschaften

In diesem Kapitel werden zunächst die Ergebnisse der Voruntersuchungen bezüglich der Technik und der Kameraeigenschaften vorgestellt. Um reproduzierbare Resultate zu erzielen, muss im Vorfeld der Strahlengang, sowie die vom Nutzer einstellbaren Kameraeigenschaften optimal angepasst werden. Nach Festlegung der Parameter folgen anschließend die Ergebnisse der Experimente zur Viskositätsbestimmung von Wasser, Tränenflüssigkeit und Vergleichsproben.

Die zentralen Größen, um ein möglichst gutes und schnelles "Tracking" zu erzielen, ist neben der Bildqualität die Bildfolgefrequenz (Bildrate). Um die geeignetste Auswahl der Kameraeigenschaften zu treffen, wurden die Bildrate, das Bildrauschen, die Linearität des CMOS-Sensors und das Auflösungsvermögen untersucht.

4.1.1 Bildrate

Die Bildrate, in Abhängigkeit der dargestellten Größe und Position der ROI, wurde mit Hilfe eines Python-Programms ermittelt und in Form von Diagrammen dargestellt. Die Größe und Position der ROI hat Einfluss auf die Auslesegeschwindigkeit der Kamera. Das Setzen der ROI bewirkt, dass nicht alle Sensorsegmente ausgelesen werden, sondern nur der relevante kleine Bereich der gesetzten ROI. Das hat folglich Einfluss auf die Bildrate.

Zur Bestimmung der Bildrate werden drei verschiedene Situationen untersucht:

- 1) ein Bildstreifen mit variabler Breite und voller Höhe
- 2) ein Bildstreifen mit voller Breite und variabler Höhe
- 3) ein Quadrat mit fester Breite und Höhe aber variabler Position

Für Situation 1 wurde die Startposition des Bildausschnittes am linken Rand ($x=0$) positioniert. Die Bildbreite (bei konstanter Bildhöhe) der ROI wird ausgehend von einem kleinsten Startwert von 100 px schrittweise vergrößert (siehe Abbildung 12 (a)). Analog dazu wird in Situation 2 in einer anschließenden Messung die Startposition des Bildausschnittes am oberen Rand ($y=0$) festgelegt, und die Bildhöhe wird ausgehend von einem Startwert von 100 px schrittweise erhöht (siehe Abbildung 12 (b)).

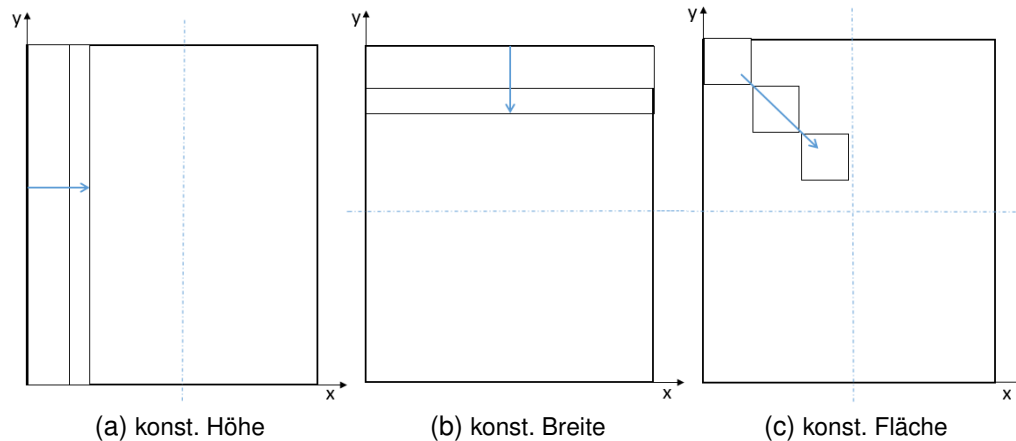


Abbildung 12: Schematische Darstellung der Untersuchung der ROI-Größe und Position auf die Bildrate. Die ROI wird ausgehend von verschiedenen Ausgangspositionen vergrößert. (a) bei konstanter maximaler Höhe und variabler Breite. (b) bei konstanter maximaler Breite und variabler Höhe. (c) Bewegung eines konstanten Bildausschnitts einer Größe von 100 px x 100 px diagonal durch das Kamerabild.

In Situation 3 wird der Einfluss der ROI-Position bei konstanter Größe des Bildausschnittes untersucht. Ein Bereich von 100 px x 100 px wird in seiner Position diagonal in X- und Y-Richtung, d.h. von der linken oberen in die rechte untere Ecke bewegt (siehe Abbildung 12 (c)).

Zu jedem Bildausschnitt in den drei Situationen wird die dazugehörige Bildrate ermittelt, ausgegeben und verglichen. Die benötigte Zeit zur Aufnahme von 10000 Bildern wird am Ende der Programmschleife gestoppt, durch die Anzahl der Bilder dividiert und in Wertetabellen gespeichert. Dargestellt ist in Abbildung 13 (a) und (b) doppellogarithmisch die Bildrate in Abhängigkeit der ROI-Größe.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Bildrate bei zunehmender Bildhöhe stark abfällt, bei zunehmender Bildbreite allerdings über einen großen Bereich konstant bleibt. Folglich hat die Bildhöhe einen großen Einfluss auf die Bildrate (siehe Abbildung 13 b), während die Bildbreite erst ab einer Breite von über 1000 px die Aufnahme verlangsamt (siehe Abbildung 13 a). Dies entspricht etwas weniger als der halben Kamerabildgröße.

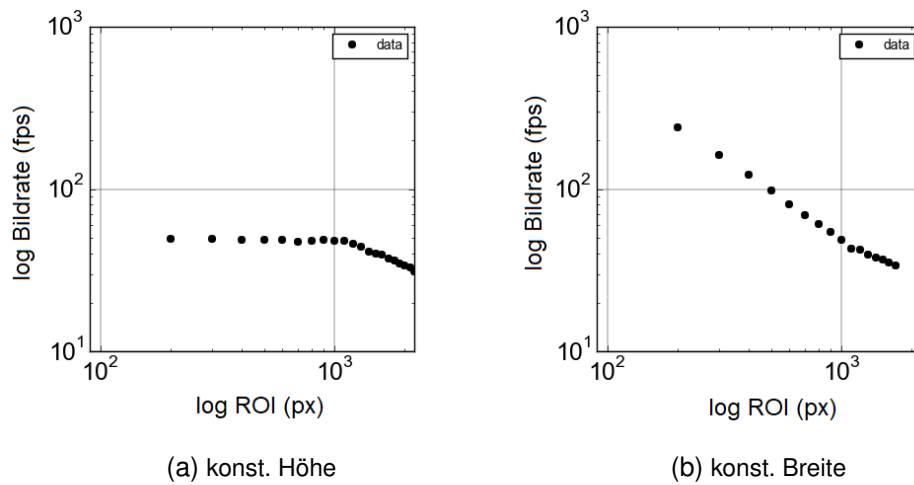


Abbildung 13: Aufgetragen sind doppellogarithmisch die Bildrate gegen die Pixelanzahl (ROI-Größe). Die ROI wird ausgehend von verschiedenen Ausgangspositionen vergrößert. (a) Bildrate bei Situation 1 (siehe Abbildung 12 a). Die Bildrate bleibt bis zu einer Breite von 1000 px konstant bei 50 fps und fällt dann ab. (b) Bildrate bei Situation 2 (siehe Abbildung 12 b). Die Bildrate fällt mit zunehmender Höhe ab.

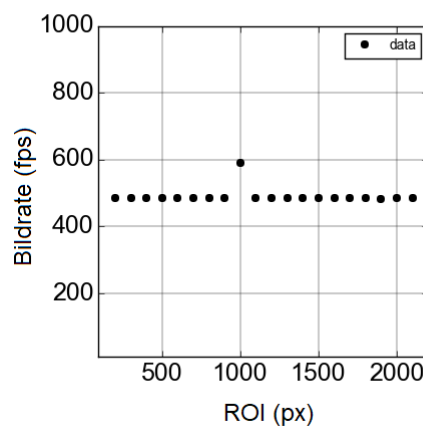


Abbildung 14: Aufgetragen ist die Bildrate gegen die Pixelanzahl (ROI-Größe). Bewegung eines konstanten Bildausschnitts einer Größe von 100 px x 100 px diagonal durch das Kamerabild (siehe Abbildung 12 c). Die Bildrate bleibt konstant auf einem Wert von 500 fps, außer bei der Position 1000 px, bei der die Bildrate auf 600 fps ansteigt.

Bei Situation 3 ergab sich eine konstante Bildrate, unabhängig von der Position der ROI (siehe Abbildung 14). Ein einzelner Ausreißer wurde bei einer Startposition der ROI von 1000 px gemessen, hier steigt die Bildrate von 500 fps auf 600 fps an. Dies ist darauf zurückzuführen, dass die Pixel des Bildsensor sowohl nach oben und nach

unten hin ausgelesen werden. Eine ROI oberhalb der Mittellinie wird also nur nach oben hin ausgelesen, eine ROI unterhalb der Mittellinie nur nach unten hin. Eine ROI, welche die Mittellinie schneidet, wird sowohl nach oben als auch nach unten ausgelesen, was die Bildrate geringfügig steigert. Ansonsten konnte die Bildrate konstant in angestrebter Frequenz erzielt werden.

Weiterhin hat die Belichtungszeit großen Einfluss. Die Bildrate kann nie größer werden als das Inverse der Belichtungszeit. Im Folgenden wird eine ROI von 100 px x 100 px mit einer Bildrate = 481.65 fps und eine Belichtungszeit von 1 ms verwendet.

4.1.2 Bildrauschen

Die einstellbaren Kameraeigenschaften (siehe Anhang “Ausgabe Kameraeigenschaften“) ermöglichen eine Reduzierung des systematischen Fehlers. Das heißt, dass der Gesamtfehler fast ausschließlich von zufälligen Fehlern (Photonen-Schrotrauschen) abhängt. Die Standardabweichung, die als Maß für das Rauschen dient, wird mit Hilfe eines Python-Programms berechnet und in der Konsole ausgegeben. Eine bessere visuelle Einschätzung der einzelnen Pixelintensitäten erfolgt mit Hilfe von Abbildung 15.

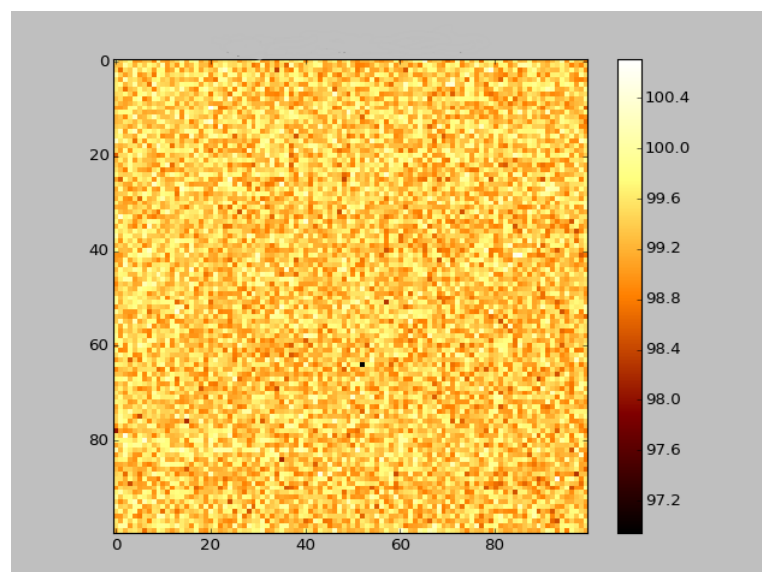


Abbildung 15: Dargestellt sind die Intensitäten der einzelnen Pixel einer ROI (100 px x 100 px), aufgenommen bei einer Belichtungszeit von 1 ms. Die Stärke der einzelnen Intensitäten sind durch eine Farbskala dargestellt.

Die Abbildung zeigt eine geringe Helligkeitsschwankung, die zudem durch einen dunklen Pixel im mittleren Bildbereich beeinflusst wird. Ebenso gibt es vereinzelt hellere Pixel, sogenannte “Hot Pixel“, die extra im Abschnitt 4.1.3 untersucht werden. Um die syste-

matischen Unterschiede durch diese Pixel zu reduzieren wurde ein Dunkelbild erstellt (gemittelt aus 100 Bildern) bei der ein Bild mit Belichtungszeit 1 ms bei geschlossenem Shutter aufgenommen wurde. Dieses Dunkelbild wird von allen aufgenommenen Bildern abgezogen.

Bestimmung des Rauschlevels bei der Bestimmung der Beadposition

Um das Rauschlevel zu ermitteln wird ein Bead einer eingetrockneten Probe vermessen. Alle 200 Tracks werden am selben noch leuchtenden und im Stillstand befindlichen Bead gemessen. Die XY-Daten des Beadschwerpunktes sollten stets gleich sein, da das Bead seine Position nicht ändert. Unterschiede werden ausschließlich durch die Bildgebung hervorgerufen. Abgebildet wird die mittlere quadratische Verschiebung des gemessenen Beads (grüne Punkte).

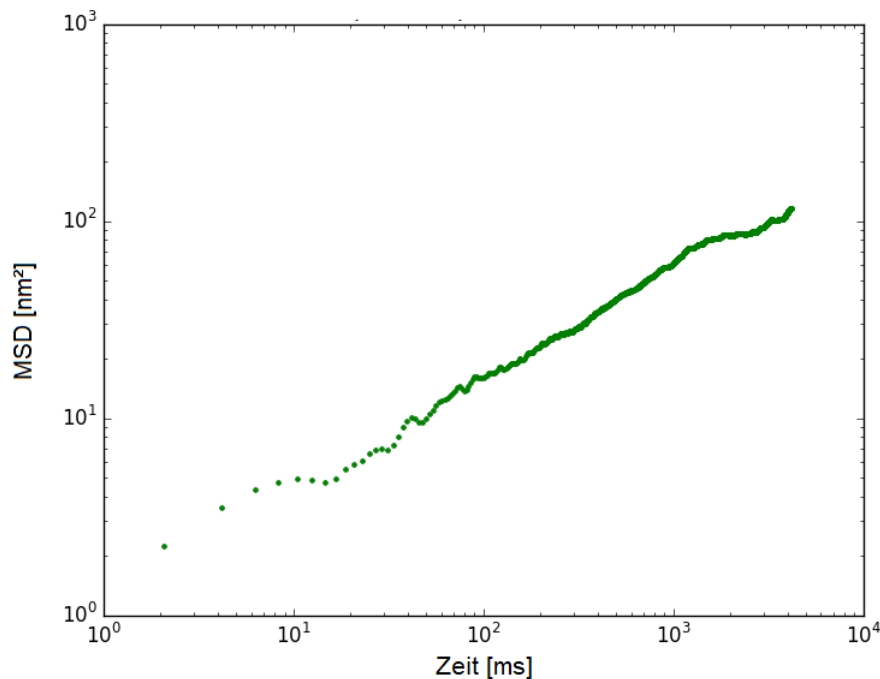


Abbildung 16: Messergebnis des Rauschen beim Tracking. Gegeneinander aufgetragen ist doppellogarithmisch die mittlere quadratische Verschiebung der einzelnen Beads (grüne Punkte) gegen die Zeit. Für die Messung wird in einer eingetrockneten Probe ein Bead für 1000 Zeitschritten getrackt.

Das Rauschlevel bzw. die Werte der mittleren quadratischen Abweichung bewegen sich unterhalb der Messwerte eines beweglichen Beads in Wasser und dabei ist davon auszugehen, dass die Viskositätsmesswerte nicht beeinflusst werden. Der Fehler auf die Beadposition konnte auf einen Wert von 2 nm - 4 nm bestimmt werden.

Die Trackingungenauigkeit (Scheinbare Verschiebung des stationären Beads zwischen zwei Bildern) ist damit weniger als 1% der erwarteten Verschiebung zwischen zwei Bildern für ein in Wasser diffundierendes Bead. Somit spielt der Fehler durch die Bildgebung und das Tracking eine vernachlässigbare Rolle bei der Bestimmung der Diffusionskonstante und damit der Viskosität.

Thermischer Drift

Zur Untersuchung des thermischen Drifts werden zwei Behälter mit 100 ml und 100 °C heißen Wasser als Wärmequelle auf dem Objektisch direkt neben einer getrockneten Wasserprobe positioniert. Wiederholt wird ein noch leuchtendes und ausschließlich durch den Wärmeeinfluss bewegtes Bead betrachtet. Nach einer kurzen Wirkzeit (ca. 3 min) wird zeitgleich die Messung eingeleitet und die Wärmequelle entfernt.

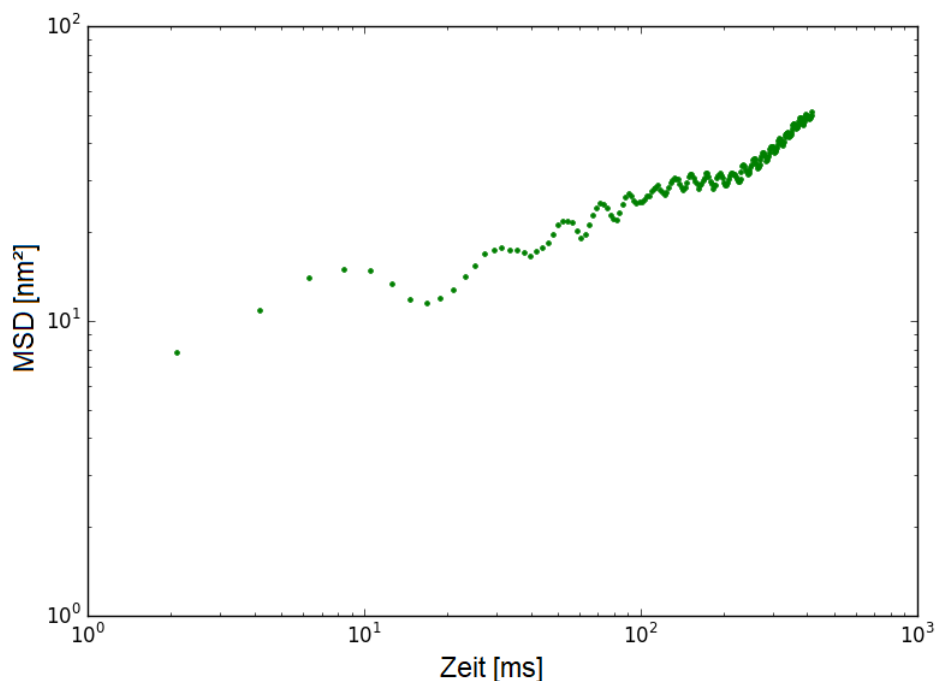


Abbildung 17: Abgebildet ist doppellogarithmisch die mittlere quadratische Abweichung in Abhängigkeit der Messzeit. Vor Einleitung der Messung werden zwei Wärmequellen in Probennähe platziert und zeitgleich mit dem Start der Messung entfernt. Für die Messung wird ein eingetrocknetes Bead für 1000 Zeitschritten à 2 ms untersucht (grüne Punkte).

Die Abbildung 17 zeigt die mittlere quadratische Verschiebung in Abhängigkeit von der Zeit. Standardmessungen haben einen zumeist linearen Verlauf. Im Gegensatz dazu zeigt das thermische Driften keinen linearen Verlauf. Es ist eine sinusförmige Entwicklung erkennbar, deren Amplituden im zeitlichen Verlauf kleiner werden. Dies zeigt den Einfluss der Temperaturschwankung und ein damit verbundenen Messfehler bei der Bestimmung der Beadposition. Konstante Labortemperaturen sind daher für die Messge-

naugigkeit des Trackings nicht notwendig, allerdings ist die Viskosität von Wasser (und damit auch anderer Proben) temperaturabhängig (ca. 5 % bei $\Delta T = 5^\circ\text{C}$). Deswegen sollte für Messungen trotzdem auf eine konstante Temperatur geachtet werden.

4.1.3 Linearität des CMOS-Sensors

Um die Linearität (Konstanz der lichtempfindlichen Eigenschaften) der einzelnen Pixel des CMOS-Sensors zu untersuchen, werden 30 Bilder in einem Pixelbereich 100 px x 100 px aufgenommen und jeder Pixel in Abhängigkeit der gemittelten Intensität aller betrachteten Pixel dargestellt. Die folgende Abbildung zeigt einen Bildausschnitt von 20 px x 20 px (siehe Abbildung 18).

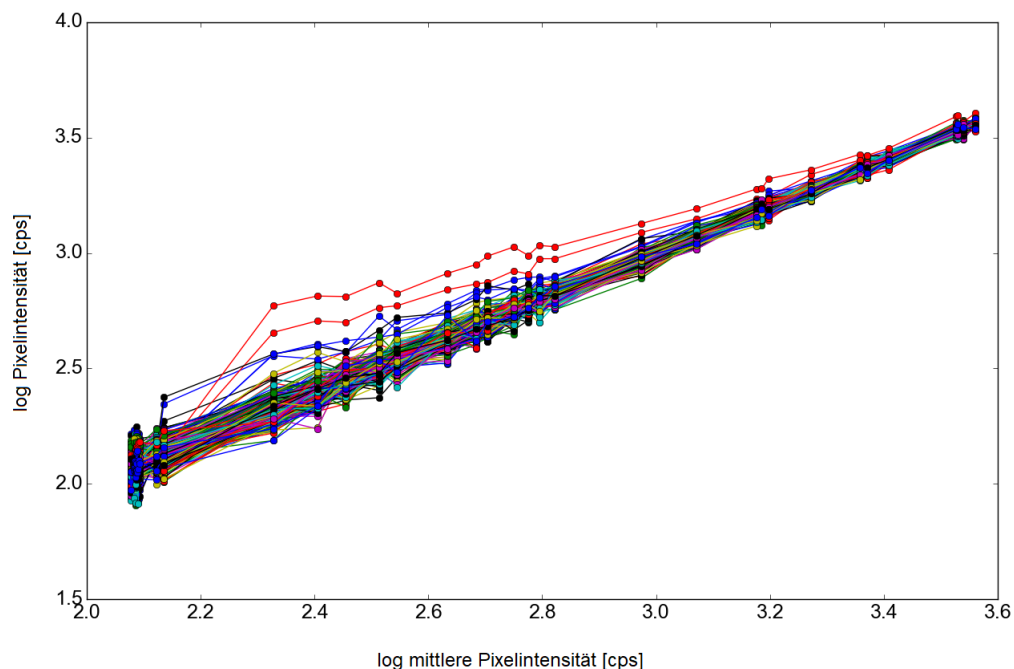


Abbildung 18: Pixelintensitäten in Abhängigkeit der mittlere Intensität (20 px x 20 px).

Der gewählte kleinere Bildausschnitt ermöglicht eine erhöhte Homogenität und eine damit verbesserte Vergleichbarkeit der einzelnen Pixel. Die Diagramme zeigen einen deutlichen linearen Verlauf mit vernachlässigbaren Abweichungen. Die Streuung der Mittelwerte bewegt sich dabei, wie erwartet, um die Winkelhalbierende. Die Steigung aller betrachteten Pixel beträgt also 1.

Bei Betrachtung der Kurven, die $> 7\%$ von der Steigung 1 abweichen, zeigen im betrachteten Bereich 4 der Pixel eine um Faktor 2 größere Abweichung vom Mittelwert. Diese Pixel sind sensitiver, da ihr Wert sich deutlich vom Mittelwert abhebt. Die Pixel weisen keinen erhöhten Dunkelwert auf, sind also keine Hotpixel im klassischen Sinne. Bei niedrigen Lichtintensitäten reagieren sie allerdings deutlich sensitiver als die benachbarten Pixel, werden also nur bei Lichteinfall "hot". Bei stärkerer Belichtung gehen die Unterschiede immer weiter zurück, bis sie schließlich bei voller Belichtung wieder auf den Maximalwert zusammen fallen (siehe Abbildung 19).

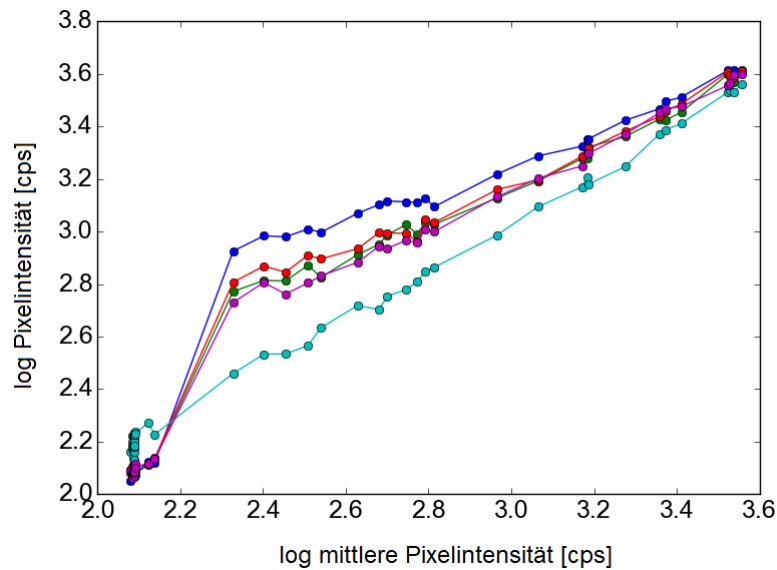


Abbildung 19: Pixelintensitäten in Abhängigkeit der mittleren Intensität von 4 (aus insgesamt 10,000 untersuchten) Pixeln mit einer Nichtlinearität von $> 7\%$.

4.1.4 Auflösungsvermögen

Die Bestimmung des Auflösungsvermögens erfolgte mit Hilfe des Kalibrationsslides. Dazu wird ein Bild der 0,01 mm Kalibrationsgeometrie aufgenommen (siehe Abbildung 20), d.h. die Abstände der kleinen Elemente sind exakt 0,01 mm voneinander entfernt. Die Aufnahme erfolgte im Hellfeld.

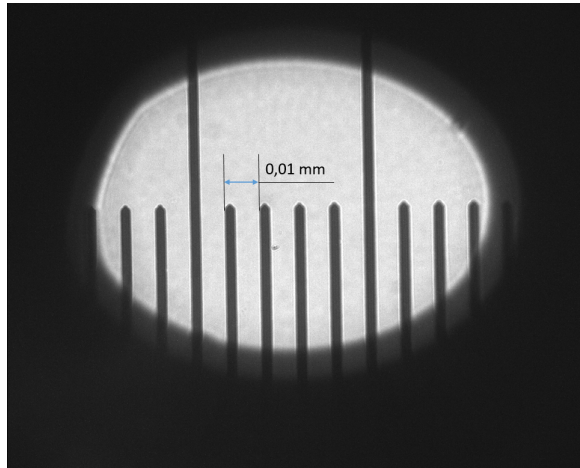


Abbildung 20: Pixelgrößenbestimmung mit Hilfe einer Hellfeldaufnahme der 0,01 mm Geometrie des Kalibrationsslides mit der Kamera.

Anschließend wird dieser Abstand mit Hilfe des “Fiji-Programms” (Bildbearbeitungsprogramm) in Pixel ermittelt. Der Strichabstand 0,01 mm entspricht 154 px. Das heißt $1 \text{ px} \hat{=} 65 \text{ nm}$.

4.2 Messung und Auswertung

Die Zielstellung einer Viskositätsmessung mit gleichzeitiger Echtzeitverfolgung umzusetzen, kann mit Hilfe eines Python-Programmes mit Nutzung einer Schnittstelle zum MicroManager-Softwarepaket erreicht werden. Die geforderte Echtzeitbetrachtung erfolgt über das Programm “Viewer”. Die Benutzeroberfläche gibt ein direktes feedback und erleichtert dadurch zum einen die Positionierung des Präparates auf dem Objektiv und zum anderen die optimale Einstellung der Fokusebene. Durch eine fehlende motorisierte Verfahrensmöglichkeit des Probenträgers erfolgt derzeit ein Anpassen durch manuelle Verschiebung.

Der Aufbau ermöglicht neben den Fluoreszenzaufnahmen eine Hellfeld-Betrachtung der Probe. Eine in mehrere Richtungen verschiebbare LED kann über dem Präparat positioniert werden und leuchtet das betrachtete Feld hell aus (siehe Abbildung 21). Diese Einstellung bietet die Möglichkeit neben den Fluorochromen auch nicht fluoreszierende Strukturen zu untersuchen. Ebenso ermöglicht dies ein Verfolgen von Wechselwirkungen zwischen den Beads und den Strukturen. Dies kann Aufschluss auf die zeitliche Veränderung der Probe geben.

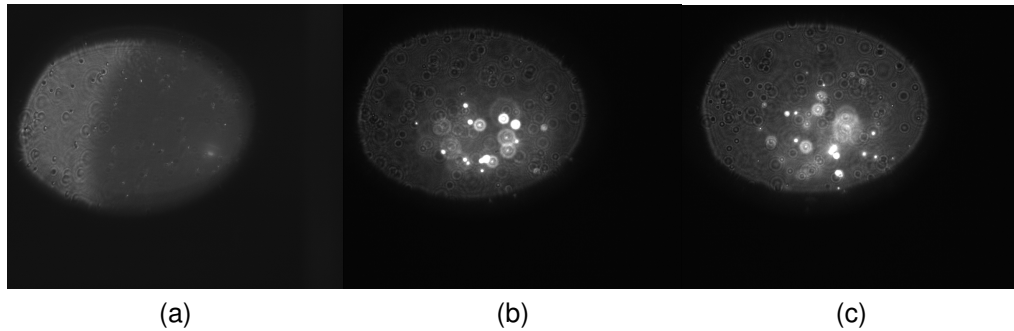


Abbildung 21: Wasser-Probe mit Beads im Hellfeld (a) ohne (b) und (c) mit Laserstrahlung, Betrachtung in unterschiedlichen Fokus-Ebenen.

Die eigentliche Messung erfolgt ohne Hellfeld-Beleuchtung und einem zusätzlichen Abdunkeln der Probe durch das Verschließen der Kammer auf dem Objektisch. Die Kammer wird nach dem Auflegen der Probe mit schwarzen und nicht reflektierenden Platten verschlossen. Die Probe wird auf der Seite des Deckglases mit einem Tropfen Immersionsflüssigkeit (Type F, Leica) benetzt und auf des Objektiv gelegt. Anschließend wird die Fokus-Ebene manuell über die ObjektivEinstellung angepasst, solange bis das Objektiv mit der Probe über den Ölfilm verbunden ist. Solange diese Verbindung nicht abreißt ist eine Beobachtung der Beads innerhalb der Fokus-Ebene gewährleistet. Durch das Driften der Beads in drei Raumrichtungen (x , y , z) ändert sich deren detektierte Intensität und damit die Intensitätsdifferenz zum Hintergrund.

Wurde eine geeignete Stelle mit Beads ausfindig gemacht (siehe 22 (a)) kann die Messung gestartet werden. Dabei ist darauf zu achten, dass nicht die unterste Ebene in der Nähe der Grenzfläche gewählt wird, da ein schwerkraftbedingtes Sinken der Beads nach einer bestimmten Zeit zur Zunahme und zum Verklumpen der Beads führen würde (siehe 22 (b) und (c)).

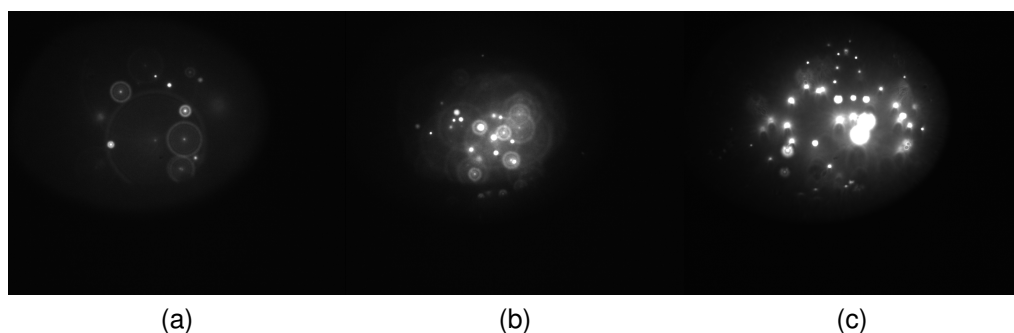


Abbildung 22: Wasser-Probe ohne Brightfield Beleuchtung in der untersten Fokusebene (a) zu Beginn einer Messung, (b) fluoreszierende Beads nach ca. 1 h, (c) fluoreszierende Beads nach ca. 2 h.

Die Messung bzw. das möglichst schnelle “Tracken” der Beads wird, wie in Kapitel 3.3 beschrieben, umgesetzt und muss mehrere Abfragen (siehe Tabelle 7) erfüllen.

Tabelle 7: Zusammenfassung der charakteristischen Abfragebedingungen

Helligkeitsgrenze	das Bead muss eine Intensität von mindestens 1280 Counts aufweisen
Bead-Größe	muss zwischen 25 px und 300 px liegen
Randbereich	das Bead bzw. ein zweites Bead darf nicht den Rand der ROI berühren

In Abbildung 23 (links) ist ein Plot des Kamerabildes mit Beads in der Fokusebene abgebildet. Im Hintergrund des Programmes erfolgt bei jeder Beadauswahl eine Intensitäts- und Flächenabfrage, die nicht vom “Viewer” angezeigt wird. Die Beads weisen laut Hersteller alle einen Durchmesser von $1\text{ }\mu\text{m}$ auf. Allerdings weicht die scheinbare Größe davon ab, da Beads außerhalb der Fokusebene größer abgebildet werden. Das Programm bestimmt die Fläche jedes Beads (siehe Abbildung 23 (rechts)).

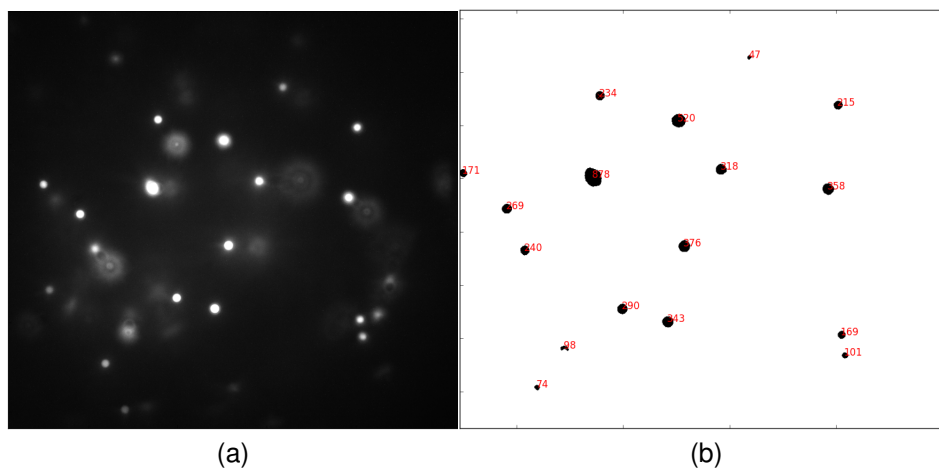


Abbildung 23: Größe bzw. Flächenbestimmung der Beads. (a) Vieweransicht (b) Mit dem Schwellenwert binarisiertes Bild. Schwarze Regionen sind über dem Schwellenwert und damit potentielle Beads (schwarze Punkte) mit ermittelter Größe (rote Zahl) für die Auswahl des besten Beads.

Unter Berücksichtigung der charakteristischen Abfragebedingungen werden alle Beads auf ihre Eignung überprüft und ein “Best Bead” ausgewählt. In Abbildung 24 weist das ausgewählte Bead eine Fläche von 213 px auf und ist durch ein rotes Kreuz gekennzeichnet.

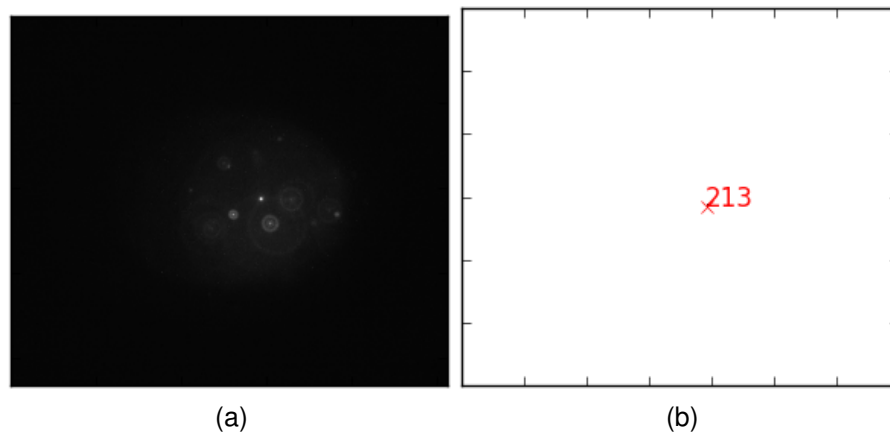


Abbildung 24: Größe bzw. Flächenbestimmung des "Best Bead". (a) Vieweransicht (b) binariertes Bild, bei dem hier nur das "Best Bead" (rotes Kreuz) mit ermittelter Größe (rote Zahl) gezeigt wird.

Die Auslesegeschwindigkeit ist, wie in Kapitel 4.1.1 ermittelt, abhängig von der Größe des Bildes. Durch Setzen der ROI auf einen 100 px x 100 px Bereich wird während der Messung eine Bildrate von ca. 470 fps - 480 fps ermöglicht. Sie wird zusammen mit der Kamertemperatur bei jedem Track mit vom Programm ausgegeben.

Nach dem automatischen Setzen der ROI (siehe Abbildung 25 rote Markierung) muss das Bead auch weiterhin mehrere Bedingungen erfüllen (siehe Tabelle 7) und wird dauerhaft erfasst.

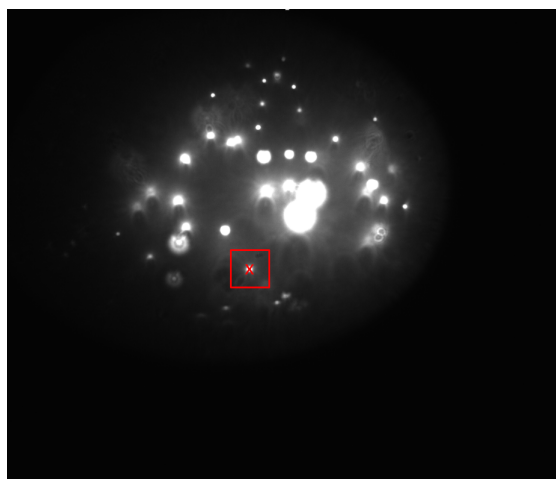


Abbildung 25: Abgebildet ist ein Ausschnitt des Kamerabildes mit einer schematischen Darstellung der Auswahl des "Best Bead" (rotes Kreuz) und der ROI (rotes Quadrat).

Falls einer der Charakteristika nicht erfüllt ist, führt dies zu einem Abbruch bzw. nicht werten des "Tracking"-Prozesses. Wird beispielsweise die ROI vom Bead verlassen,

oder von einem zweiten Bead betreten, erscheint die Meldung "touches border" und das Bead wird nicht weiter ausgewertet. Sind alle Charakteristika über den gesamten Messzeitraum erfüllt, werden 1000 Bilder aufgenommen und ausgewertet. Anschließend wird die Messung automatisch gestoppt und die Suche nach dem nächsten Bead wiederholt. Der "Viewer" wechselt dabei zurück auf das gesamte Kamerabild.

Um die XY-Positionen des Beads zu ermitteln wird die sogenannte "weighted center of mass" bestimmt, dabei wird der Mittelpunkt über den Schwellenwert der maskierten Beadform bestimmt, wobei jedes Pixel mit seiner Intensität gewichtet wird. Je Bild wird ein XY-Wert mit dazugehörigen Zeitstempel in einer Liste abgespeichert (siehe Abbildung 26). Die gesetzte Maske bewirkt ein einschränken der Fläche auf die Beadgröße innerhalb der ROI.

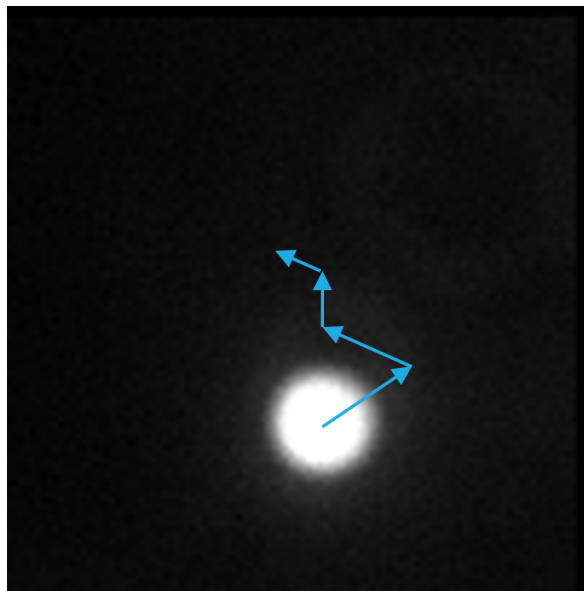


Abbildung 26: Schematische Darstellung der Beadverfolgung in der ROI (100 px x 100 px). Der Schwerpunkt des ausgewählten Beads wird innerhalb der ROI getrackt und die XY-Positionen in einer Liste gespeichert.

Für jedes Bead wird eine eindeutige Beadnummer vergeben. Derzeit ist ein mehrmaliges "tracken" des gleichen Beads mit Hilfe des Programmes nicht auszuschließen und kann negativen Einfluss auf die Messgenauigkeit haben, da es zum mehrmaligen tracken beeinflusster Beads kommen kann. Für eine Erhöhung der Statistik müssen unterschiedliche Beads getrackt werden, da die Beads nicht alle identisch in Form und Größe sind.

4.2.1 Messgenauigkeit

Für die Überprüfung der Funktion des Auswertungsprogrammes wird zunächst ausschließlich die Viskosität Wasser gemessen. Der Literaturwert für die Viskosität von Wasser lautet 0,89 mPa s bei 25 °C Raumtemperatur [21]. Das folgende Histogramm zeigt die Beadnummer in Abhängigkeit der Viskosität (siehe Abbildung 27).

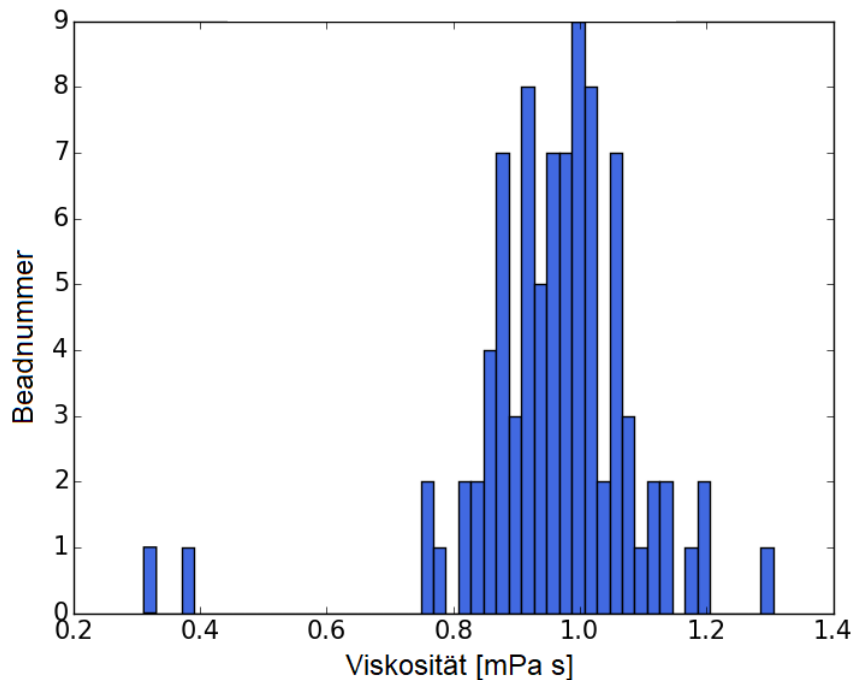


Abbildung 27: Histogramm einer Wasseruntersuchung. Bestimmung des Viskositätswertes von Wasser der laut Literatur bei 0,89 mPa s liegt [21]. Das Histogramm zeigt einen Mittelwert von 0,95 mPa s, bei einer Temperatur von 25 °C.

Die Werte bestätigen eine korrekte Funktionsweise des Programmes. Gemessen wird eine Viskosität von 0,95 mPa s, die ca. 7 % über dem erwarteten Wert liegt. Diese Abweichung ist auf eine mögliche Temperaturschwankung zurückzuführen. Aus diesem Grund wird in anschließenden Arbeiten der Temperaturwert zu jedem Zeitpunkt bestimmt.

Das Programm erstellt aus den bereits beschriebenen Listen (siehe Kapitel 3.3) der gemessenen Parameter zwei Diagramme (siehe Abbildung 28) und eine weitere Liste mit den geometrischen Mittelwerten der Viskosität. Die Diagramme zeigen zum einen die mittlere quadratische Verschiebung (MSD) in Abhängigkeit der Zeit (siehe Abbildung 28 oben) und zum anderen eine grafische Darstellung der Zufallsbewegung eines einzelnen Beads (Abbildung 28 unten). Um die Genauigkeit zu erhöhen werden im folgenden Standardmessungen durchgeführt, d.h. es werden insgesamt 200 Beads für 1000 Zeitschritte getrackt und in Listen gespeichert. Die Diagramme in den Abbildungen 28 und 29 zeigen das selbe getrackte Bead.

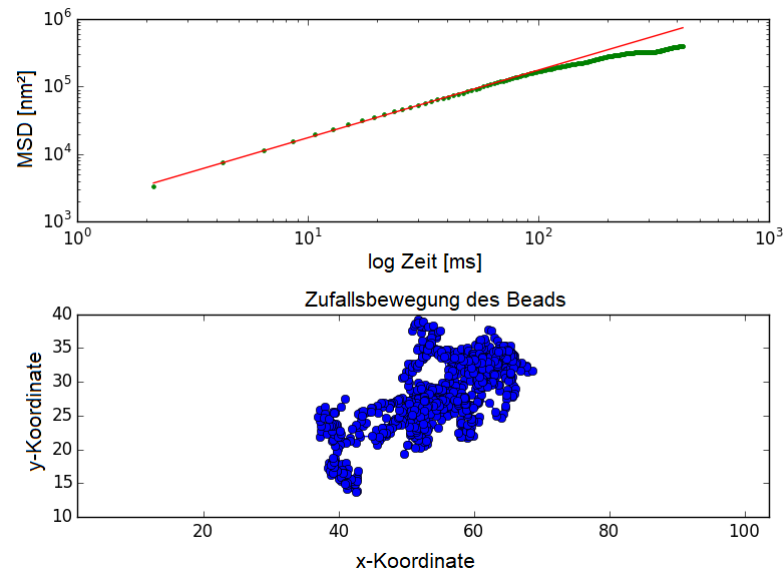


Abbildung 28: Mittlere quadratische Verschiebung (MSD) über die Zeit mit Fit-Funktion über die ersten 10 MSD-Werte (Oben) und Zufallsbewegung des gemessenen Beads (Unten).

Der Unterschied zwischen Abbildung 28 und 29 liegt in der Fit-Funktion. Um die Ungenauigkeit bei der Berechnung der Fit-Funktion geringer zu gestalten, wird der kleinste MSD-Wert ab sofort nicht mehr mit einbezogen (siehe Abbildung 29).

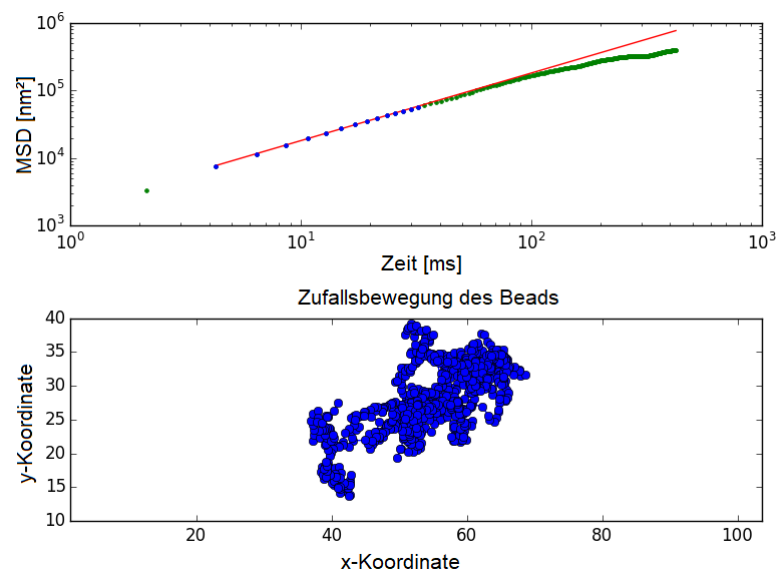


Abbildung 29: Mittlere quadratische Verschiebung (MSD) über die Zeit mit Fit-Funktion ohne den ersten MSD-Wert (Oben) und Zufallsbewegung des gemessenen Beads (Unten).

Die logarithmischen Graphen werden mit einer Gerade mit Steigung eins gefittet:

$$\log(y) = 1 \cdot \log(x) + t$$

Steigung eins entspricht dabei einer freien, ungerichteten Diffusion. Der y-Achsenabschnitt t der Gerade gibt Aufschluss über die Diffusionskonstante. Für einen genaueren Fit werden im späteren Verlauf nur die Fit-Funktion in Abbildung 29 verwendet. Dabei gilt, je steiler der Anstieg des Verlaufes, desto gerichteter die Bewegung des Teilchens. Zum Ende der Messung hin, bewegen sich die Beads nicht mehr so stark, das kann ggf. auf die Position des Beads in der Flüssigkeit zurück geführt werden. Das Fluoreszenz-bead kann sich zum Zeitpunkt der Messung in einem Z-Ebenen Drift oder in der Nähe des Flüssigkeitsrands befunden haben. Dies würde die Persistenz beeinflussen.

Das untere Diagramm in Abbildung 29 zeigt die Zufallsbewegung eines Beads über den Zeitraum der Messung. Dargestellt sind die einzelnen XY-Werte. Die Anzahl der Wertepunkte wird bestimmt durch die Erfüllung der Charakteristika oder entspricht der Zahl der maximal getrackten Beads.

Die erste Wasserprobenmessung ergab einen zu großen Messwert. Um eine genauere Aussage treffen zu können folgt die Auswertung von 10 Messungen (siehe Abbildung 30). Dabei werden drei Messungen mit dem großen Frame und sieben mit dem kleinen Frame (siehe Kapitel 3.1) durchgeführt, um eine diesbezügliche Abhängigkeit von der Viskosität ebenfalls auszuschließen.

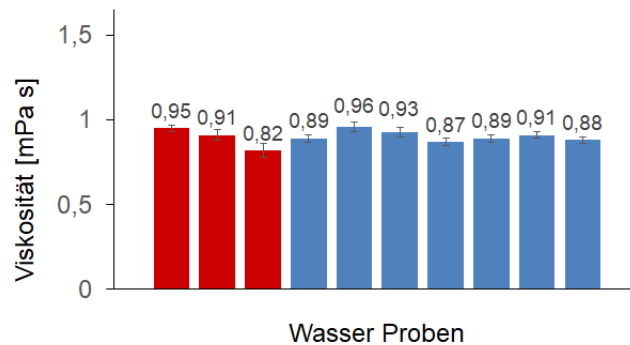


Abbildung 30: Ergebnisse von Viskositätsmessungen von Wasser, Probe 1-3 (rot) werden mit dem großen Frame und Proben 4-10 (blau) mit dem kleinen Frame gemessen. Dargestellt ist die gemessene Viskosität der einzelnen Proben.

Tabelle 8: Viskositätsmesswerte von Wasser

Messung	Viskosität [mPa s]
1	$0,95 \pm 0.02$
2	0.91 ± 0.03
3	0.82 ± 0.04
4	0.89 ± 0.02
5	0.96 ± 0.03
6	0.93 ± 0.01
7	0.87 ± 0.02
8	0.89 ± 0.02
9	0.91 ± 0.02
10	0.88 ± 0.02
Mittelwert:	0.90 ± 0.04

Die Auswertung dieser Wasserprobenmessung (siehe Tabelle 8) ergaben einen Mittelwert von $0,90 \text{ mPa s}$ und einer relativen Streuung von 5 % (Standardabweichung/Mittelwert). Dieser Wert beschreibt die Abweichung der Messungen zueinander. Der erwartete Viskositätswert liegt wie bereits erwähnt bei $0,89 \text{ mPa s}$. Dieses Ergebnis bestätigt die Funktionsweise des Bestimmungsalgorithmus und ermöglicht im weiteren die Untersuchung von Tränenflüssigkeiten. Die Frames zeigen keinen Einfluss auf die Struktur und die damit verbundene Viskosität von Wasser. Der relative Fehler der einzelnen Messungen liegt zwischen 1 % - 4,9 %. Dieser kann beispielsweise auf die Präparation der Probe zurück geführt werden, da die Verdunstung und die Pipettierung dieser kleinen Volumina im μl Bereich großen Einfluss haben. Verluste durch Rückstände, sowie überflüssige Tropfen an der Pipettenspitze können das pipettierte Volumen verfälschen.

4.3 Synthetische Tränen

Zunächst ist bereits bei der Präparation aufgefallen, dass Augentropfen Nr. 3 und Nr. 4 sich von Nr. 1, 2 und 5 unterscheiden. Nr. 4 weist eine geringe Oberflächenspannung auf, was eine Tropfenbildung schwierig gestaltet. Die Probe verläuft innerhalb des Geneframes und bildet kein Volumen, das sich zwischen den Glasflächen des Probenträgers hält und vermessen werden kann. Nr. 3 hat eine Viskosität von $\approx 20 \text{ mPa s}$ und kann nicht korrekt gemessen werden. Das Auswertungsprogramm sortiert zu viele Messwerte als zu stark abweichend ein. Die Messungen von Nr. 1-5 ergaben folgende Ergebnisse.

Tabelle 9: Resultate synthetische Träne

Nr. synthetische Träne	Name	Viskositätswerte erste Messung in mPa s
1	Herba-Vision	$9,16 \pm 0,29$ mPa s
2	Cationorm	$1,08 \pm 0,01$ mPa s
3	Systane	nicht eindeutig Messbar
4	EvoTears	nicht Messbar
5	Bepanthen	$10,39 \pm 0,23$ mPa s

Die Resultate entsprechen ungefähr den Herstellerangaben (siehe Tabelle 9). Die Untersuchungen dienen hauptsächlich dem technischen Aspekt, wie Reproduzierbarkeit und Messbarkeit. Die unterschiedliche Viskosität hat ebenfalls Einfluss auf die Bead-Verteilung und deren Verhalten in der Probenflüssigkeit. Eine hohe Viskosität führt zu einem schnelleren Verklumpen der Fluoreszenzbeads. Das von dieser räumlichen Verteilung abhängige "Tracking" dauert auf Grund der Auswahlkriterien länger.

Nr. 2 Cartionorm weist Viskositätswerte ähnlich wie Wasser (ca. 1,1 mPa s) auf. Die Verdünnung durch die wässrige Beadlösung sollte weniger Einfluss auf den Messwert haben als bei viskoserer Flüssigkeiten. Im Vergleich dazu werden die Nr. 5 Bepanthen-topfen ebenfalls mehrfach auf ihre Reproduzierbarkeit untersucht, da diese einen vergleichsweise hohen Viskositätswert von ca. 10,4 mPa s haben.

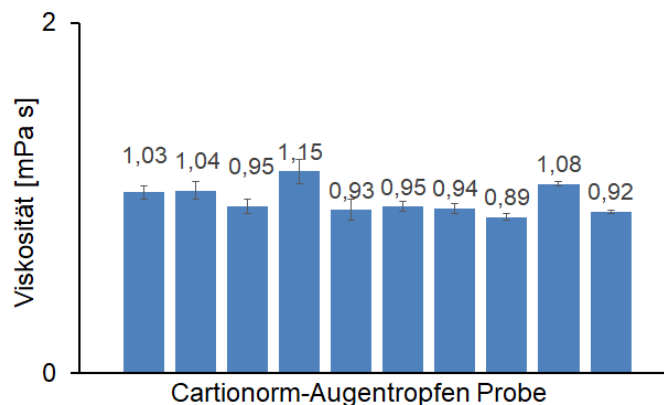


Abbildung 31: Viskositätswerte von Cartionormmessungen ohne Probenalterung. Dargestellt sind zehn Vergleichsmessungen zur Reproduzierbarkeit mit Fehlerbetrachtung.

Die Ergebnisse der Cartionorm Messungen weisen eine Reproduzierbarkeit mit einem Mittelwert von 1,09 mPa s mit einem relativen Gesamtfehler von $\approx 17\%$ auf (siehe Abbildung 31). Die einzelnen Messungen weisen einen relativen Fehler von $< 6\%$ auf. Eine mögliche Ursache für die große Abweichung könnte ein Pipettierungsfehler bei der Probenherstellung sein. Dies bestätigt die in Kapitel 4.2.1 nachgewiesene Reproduzierbarkeit von Wasser. Der relative Fehler, der hier $> 12\%$ beträgt, kann auf fehlerhafte

Präparation durch wechselndes Präparanden zurückgeführt werden, da bereits ein Unterschied zu den restlichen Proben in der Messzeit auffiel.

Im nächsten Schritt wird die Reproduzierbarkeit der Bepanthentropfen untersucht. Vermessen werden Proben, die jeweils aus frisch geöffneten Probenfläschchen stammen.

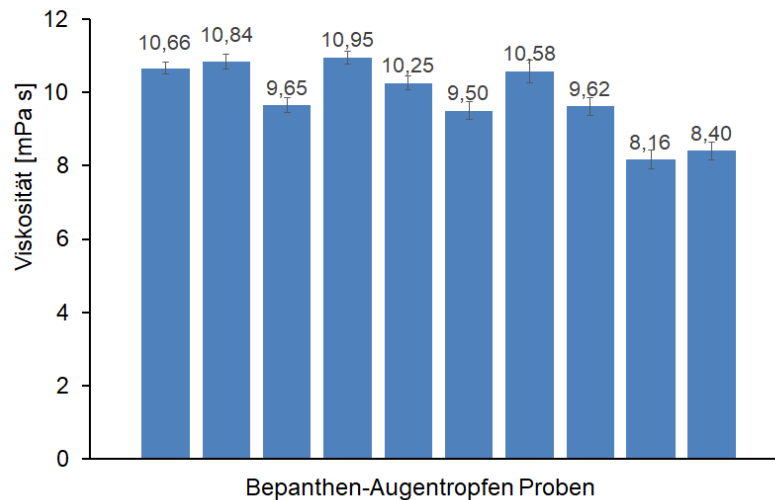


Abbildung 32: Viskositätswerte von Bepanthen-Augentropfen ohne Probenalterung. Dargestellt sind die Viskositätswerte von zehn Proben zur Reproduzierbarkeit mit Fehlerbetrachtung.

Die Bepanthentropfen sind einzeln verpackt und erhöhen so die Vergleichbarkeit der einzelnen Proben, da jeder Objektträger mit einem neuen Augentropfenfläschchen präpariert werden kann. Der Mittelwert beträgt 0,98 mPa s mit einem relativen Gesamtfehler der Proben zueinander von 9 % (Standardabweichung / Mittelwert aller Messungen) (siehe Abbildung 32).

Untersucht wird, wie groß der zeitliche Einfluss der Aufbewahrungszeit in der Kapillare auf die Viskosität der Flüssigkeit ist. Dazu werden fünf Messungen mit den Augentropfen von Bepanthen durchgeführt. Insgesamt werden 10 Kapillaren mit einem Fläschchen gefüllt und in einem Eppendorf-Gefäß ungekühlt gelagert. Die Präparation erfolgte jeweils frisch direkt vor der Messung.

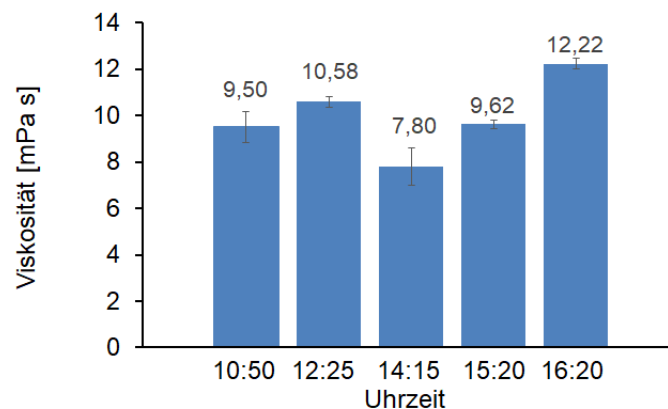


Abbildung 33: Untersuchung der Flüssigkeit in der Kapillare bezüglich ihrer Aufbewahrungszeit. Dargestellt wird die Viskosität in Abhängigkeit der Messzeit. Alle Kapillaren werden ca. 13:20 Uhr mit künstlicher Träne einer frisch geöffneten Bepanthen-Probe gefüllt ungekühlt in den Kapillaren aufbewahrt und zu den angegebenen Uhrzeiten präpariert und vermessen.

Die Schwankungen der einzelnen Messwerte zu einander sind sehr groß (siehe Abbildung 33). Der größte relative Fehler beträgt 8 % und kann auf die Verdünnung bedingt durch die Beadstammlösung und ungleichmäßige Pipettierung zurück geführt werden.

4.4 Tränenflüssigkeit und ihre Viskosität

In diesem Abschnitt werden ausschließlich die Tränen der Probanden 1-5 untersucht. Dabei werden diverse Vergleiche zwischen den Tränenarten, sowie ihrer Präparationsmöglichkeiten untersucht. Neben erneuter Messungen bezüglich der Reproduzierbarkeit, wird die Abhängigkeit der Tagesform betrachtet.

4.4.1 Proben-Gewinnung und Präparation

Die Abnahme erfolgt unter sterilen Laborbedingungen bei konstanten Temperaturen. Zudem muss die Abnahme, sowie die Präparation so schnell wie möglich erfolgen, um den Fehler der zeitabhängigen Viskositätsänderung bzw. das Stoppen der Beadbewegung klein zu halten. Die Tränen werden (siehe Kapitel 3.5.1) durch direkten Kontakt der Kapillare mit der Tränenflüssigkeit am unteren Augenrand, bei gezogenen Augenlid, gewonnen. Der Unterschied der Entnahme der zwei Tränenarten liegt neben der Reizung ausschließlich im Volumen der Kapillare (siehe Tabelle 10).

Tabelle 10: Proben-Volumen

“normale Träne“	“Reflexträne“
2 μ l	10 μ l

Nach Festlegung der optimalen Probenpräparation der “normalen Träne“ wird ein Protokoll angefertigt (siehe Anhang). Das Konzentrationsverhältnis von Beads zu Flüssigkeit entspricht dem Protokoll “*Materialvorbereitung zur Viskositätsmessung*“. Das 2 μ l Volumen der Glaskapillare pro Auge ist ausreichend um eine zuverlässige und reproduzierbare Probenpräparation zu gewährleisten. Das heißt die Probe (2 Kapillaren, links + rechts) besteht aus 4 μ l “normale Träne“ gemischt mit 0,2 μ l Beads.

Je nach verwendetem Frame werden 4,2 μ l (großer Frame) oder 2,0 μ l (kleiner Frame) Bead-Tränen-Mischung verwendet. Die ersten Messungen mit den Tränenpräparaten stammen von Proband 1. Die Träne wird für ca. 1 h vermessen und XY-Werte von 106 Beads “getrackt“. Die Abbildung 34 zeigt zwei Aufnahmen des Viewers.

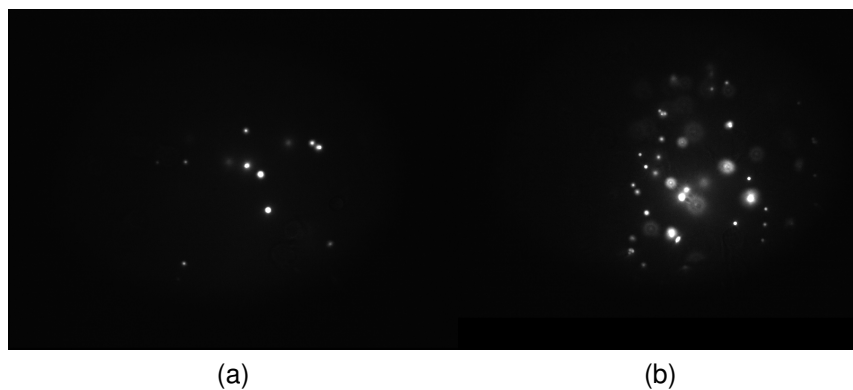


Abbildung 34: Viewer-Bild einer Tränen-Probe (a) direkt nach der Präparation, (b) ca. 1,0 h Stunde nach der Präparation.

In Abbildung 34 (a) ist eine Momentaufnahme des Viewers beim Einrichten der Probe direkt nach der Abnahme und Präparation der Träne von Proband 1 zu sehen. Beobachtet wird nicht nur eine auffällige Beadbewegung innerhalb der Fokusebene, sondern auch ein Driften in Z-Richtung. Nach optimaler Ausrichtung des Präparates wird die Messung gestartet und läuft für ca. 1 h. Das Programm findet problemlos selbstständig Beads. Abbildung 34 (b) zeigt eine Aufnahme des Viewers nach Abbruch der Messung. Wie bei der Wasser-Messung ist eine deutliche Zunahme der sichtbaren Beads innerhalb der Fokusebene zu beobachten. Vermutet wird, dass dies ebenfalls auf ein Absinken der Beads, infolge der Schwerkraft, zurück zu führen ist. Ein weiterer deutlicher Unterschied liegt in der Mobilität der Beads. Nach Abbruch der Messung ist bereits eine deutlich geringere Beadbewegung zu erkennen. Die Beads zeigen ein Intensitätsflackern bei näherer visueller Betrachtung. Gemittelt aus 200 Beads während 1 h Messzeit wird für die Probe von Proband 1 eine mittlere Viskosität von $1,32 \pm 0,02$ mPa s bestimmt.

Mit den nächsten Messungen wird untersucht, ob die Art der Präparation bzw. der Pipetierung Einfluss auf das Ergebnis hat. Dazu werden ca. 40 μl Reflextränen von Proband 5 abgenommen, auf zwei Eppendorfbehältnisse aufgeteilt und in einer Eis-Wasser-Mischung gelagert. Die Präparation der ersten vier Proben erfolgten jeweils separat kurz vor der Messung (siehe Abbildung 35 Blau). Die folgenden drei Proben werden einem mit Beads angereicherten Volumen entnommen (siehe Abbildung 35 Rot) und ebenfalls vor der Messung auf den Probenträger gegeben.

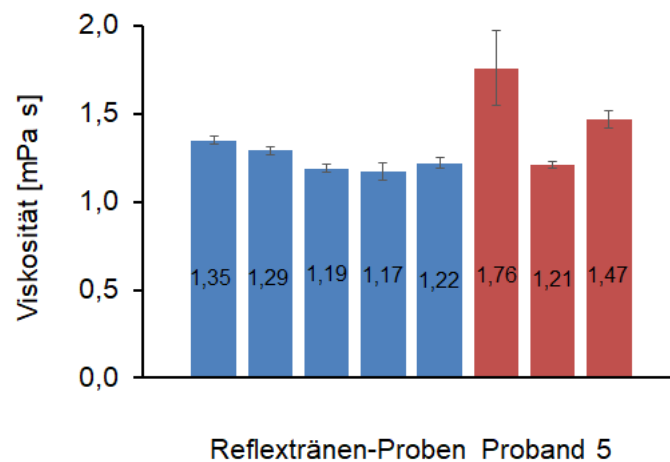


Abbildung 35: Viskositätswerte bezüglich des Einflusses der Präparation "Reflexträne" von Proband 5, großer Frame. Die "Reflexträne" wird durch eine Reizung des Auges gewonnen. Die gesamte Tränenflüssigkeit wird in zwei Eppendorfbehältnisse aufgeteilt und gekühlt aufbewahrt. Unterschieden wird die Art der Anreicherung mit Beads. Zum einen wird die Gesamte Probenmenge im korrekten Verhältnis gemischt und diese Lösung auf die Probenträger verteilt (Rot). Zum anderen wird jeder Probenträger einzeln mit Beads angereichert, fertig präpariert und gemessen (Blau).

Bereits nach der dritten Probe wird ersichtlich, dass die Art der Präparation merklichen Einfluss auf das Messergebnis hat. Bei der Anreicherung eines großen Flüssigkeitsvolumens mit Beads (Rot) und anschließendem Verteilen auf die Proben wird ein relativer Fehler von 17 % zwischen den Proben gemessen. Im Gegensatz dazu ist der relative Fehler zwischen den Ergebnissen bei den einzeln angemischten Proben (Blau) < 3 %.

4.4.2 Probenkonservierung und Viskositätsmessungen von Tränenflüssigkeit

Die Abnahme, Präparation, sowie der Transport der vom Patienten entnommenen Tränenflüssigkeit muss bedingt durch die begrenzte Verwendungszeit möglichst kurz gehalten werden. Aus diesem Grund wird überprüft, ob ein schnelles Einfrieren oder Kühlen eine Verlängerung der Verwendungszeit bewirkt. Für eine Interpretation der Ergebnisse wird im Vorfeld die Alterung der Träne ohne jegliche Beeinflussung gemessen. Weitere Untersuchungen folgen bezüglich der Tagesabhängigkeit und der Tränenarten der einzelnen Probanden.

FrISChe vs. alte Träne

Untersucht wird das Verhalten einer frischen zu einer alten Probe. Um 12:45 Uhr werden insgesamt vier Kapillaren (2x linkes-, 2x rechtes Auge) "normale Träne" von Proband 1 entnommen. Für den ersten Probenräger wird je eine Probe von jedem Auge gemischt, mit Beads angereichert und direkt gemessen. Anschließend werden die restlichen zwei Kapillaren für die Vergleichsprobe ohne Kühlung und ohne Beads aufbewahrt. Die Präparation und Messung der Vergleichsprobe folgte am selben Tag nach ca. 3,5 h (siehe Tabelle 11).

Tabelle 11: Gegenüberstellung frISChe vs. alte Träne

Uhrzeit	Probenart	Viskositätswerte
12:45	frISChe Probe	$1,34 \pm 0,02 \text{ mPa s}$
16:11	alte Probe	$1,24 \pm 0,01 \text{ mPa s}$

Die Untersuchung ergab, dass die alte im Gegensatz zur frischen Träne eine niedrigere Viskosität aufweist. Dies kann auf den bereits bestimmten Messfehler zurückgeführt werden. Ebenfalls wird angenommen, dass die Konzentrationsänderung der Tränenflüssigkeit durch einen Proteinverlust zustande kommt. Eine Proteinabsorption durch Anheften an die Wand der Glaskapillare, würde beim Entleeren der Kapillare die Träne wässriger gestalten und die Viskosität herabsetzen.

FrISChe vs. gefroren Träne

Für diese Untersuchung werden drei Proben, d.h. sechs Kapillare, von Proband 5 abgenommen. Die erste Probe dient als Vergleichsprobe und wird sofort nach der Präparation vermessen. Die anderen zwei Proben werden eingefroren. Eine fertig präpariert auf dem Objektträger und eine pure Träne in den Glaskapillaren. Die Röhrchen sind dazu in einem Eppendorf-Gefäß verschlossen und zusammen mit dem Probenräger direkt bei -20°C eingefroren. Der gefrorene fertig präparierte Probenräger wird nach sechs Tagen aufgetaut und vermessen. Anschließend erfolgt die Präparation und Messung der

in den Kapillaren gefrorenen Tränen. Die Untersuchung ergab folgende Ergebnisse:

Tabelle 12: Gegenüberstellung gefrorene zu frischer Träne 2

Probe	Viskositätswerte	Datum und Uhrzeit der Messung
präparierte Probe	$1,73 \pm 0,08 \text{ mPa s}$	23.06.17; 09:40
gefrorener Probenträger	$1,89 \pm 0,04 \text{ mPa s}$	29.06.17; 09:45
gefrorene Kapillare	$1,44 \pm 0,03 \text{ mPa s}$	29.06.17; 11:10

Die gemessenen Daten, der vorher präparierten, gefrorenen und wieder aufgetauten Probe, ergab im Vergleich zur frisch abgenommen Probe eine ca. $0,06 \text{ mPa s}$ höhere Viskosität. Der Fehler kann auf die Präparation und den Messfehler zurückgeführt werden. Ebenfalls besteht die Möglichkeit, dass ein direktes Einfrieren auf dem Proben-träger das Gelieren der Träne fördert und die Viskosität der Träne erhöht. Zudem zeigte die wieder aufgetaute Probe mehr verklumpte Beads wodurch die Messzeit deutlich anstieg (bis zu 3 h). Die gefrorene Tränenprobe aus den Kapillaren bestätigt das Ergebnis der "Frische vs. alte Träne" Untersuchung. Diese weist eine geringere Viskosität als die frische Probe auf. Dies kann wiederholt auf die vermutete Proteinabsorption an der Glaswand zurückgeführt werden und wird im Rahmen der begleitenden medizinischen Doktorarbeit von Frau Martina Braun weiter untersucht.

Nach mehrmaligem Wiederholen der Untersuchung mit unterschiedlichen Probanden wird festgestellt, dass das Alter der Träne keinen direkten Einfluss auf das Stoppen der Beadbewegung hat. Selbst mehrere Stunden alte Tränen können frisch mit Beads gemischt und vermessen werden. Dabei spielt die Art der Lagerung eine große Rolle, da beispielsweise das Aufbewahren der Träne bei Zimmertemperatur einen höheren Viskositätswert ergab. Ebenso der Zeitpunkt der Beadzugabe ist ausschlaggebend, da es vermutlich zu Wechselwirkungen zwischen den Beads und den Tränenbestandteilen kommt.

Reflex- vs. normale Träne

Untersucht wird der Unterschied zwischen "Reflexträne" und "normaler Träne". Die folgenden Diagramme sind die Ergebnisse beider Tränenarten von Proband 3 und 5 (siehe Abbildungen 36 und 37) zu entnehmen. Abgebildet sind die Viskositätsunterschiede beider Augen zueinander und zur gemischten Probe in Abhängigkeit der Messzeit. Die "Reflextränen" werden wie in Abschnitt 3.5 durch Reizung mit einer Zwiebel erhalten und gekühlt für ca. 3 h aufbewahrt. Die "normale Träne" wird vor jeder Messung frisch abgenommen, präpariert und gemessen.

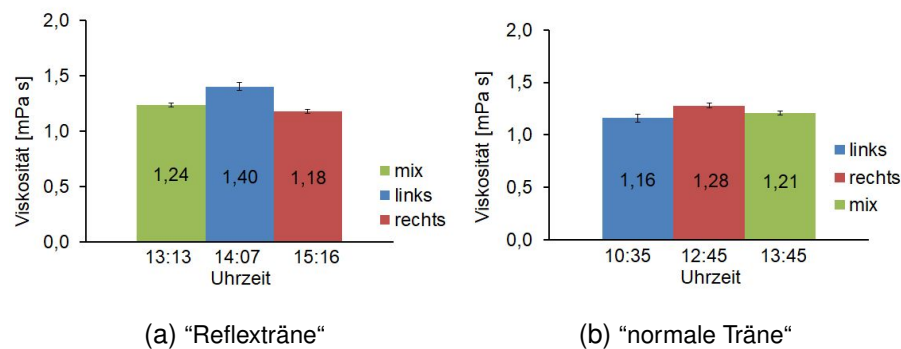


Abbildung 36: Vergleich frischer Tränen von Proband 3. Gegenübergestellt ist die Viskosität der Proben des rechten (rot), linken (blau) Auges und einer gemischten Probe (grün) in Abhängigkeit der Tageszeit. (a) "Reflextränen" abgenommen, präpariert, eingefroren und zu den angegebenen Uhrzeiten aufgetaut und gemessen (b) "normale Tränen", die zu den angegebenen Zeiten jeweils frisch abgenommen, präpariert und gemessen wird.

Die Viskosität der Tränenarten unterscheiden sich nicht signifikant, da die Abweichung dem bereits bestimmten Messfehler entsprechen. Im Gegensatz dazu ist zu erkennen, dass sich die Proben beider Augen unterscheiden (siehe Abbildung 36).

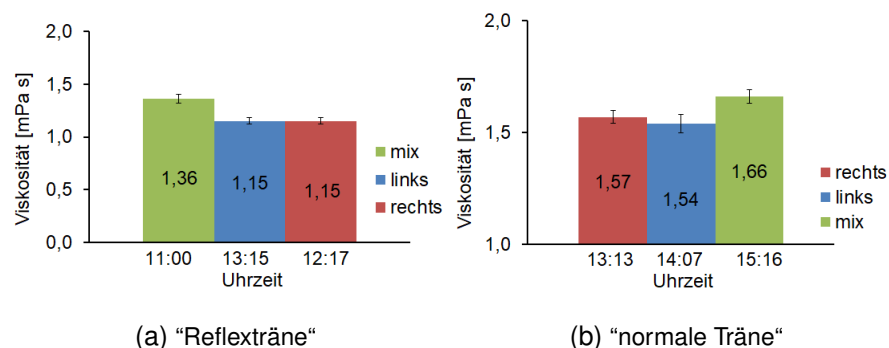


Abbildung 37: Vergleich "Reflextränen" zu "normale Tränen" von Proband 5. Gegenübergestellt ist die Viskosität der Proben des rechten (rot), linken (blau) Auges und einer gemischten Probe (grün) in Abhängigkeit der Tageszeit. Die "normale Träne" wird jeweils frisch abgenommen und direkt mit Beads angereichert. Die "Reflextränen" Probe werden bei einer Abnahme ca. 11:00 Uhr gewonnen und kühl bis zur Präparation gelagert. (a) "Reflextränen", die zu den angegebenen Zeiten jeweils frisch präpariert und gemessen wird. (b) normale Träne, die angegebenen Uhrzeiten entsprechen den Messzeiten.

Auffällig ist, dass die Viskosität der Tränenarten sich beim Proband 5 unterscheiden. Die "normale Träne" hat hier eine größere Viskosität als die "Reflexträne" (siehe Abbildung 37).

Weiter wurde festgestellt, dass die Viskositätswerte stark von Proband zu Proband variieren. Ebenso hat die Tagesform und die Flüssigkeitszunahme einen großen Einfluss. Weiterhin ist bei beiden Untersuchungen ein Anstieg der Viskosität der Mix-Probe im Vergleich zu den Einzel-Proben zu vermerken.

Linkes vs. rechtes Auge

Untersucht werden "Reflextränen" von Proband 3 (siehe Abbildung 38). Dazu werden wiederholt Tränen beider Augen einzeln und anschließend eine Mischung dieser Proben untersucht. Die Entnahme bei Proband 3 erfolgt einmalig (ca. 16:10 Uhr). Anschließend wird die Tränenflüssigkeiten auf zwei Gefäße aufgeteilt. Präparation werden die Proben des rechten (ca. 16:15 Uhr) und des linken Auges (ca. 17:14 Uhr). Die gemischte Probe aus der Flüssigkeit beider Augen wird ca. 18:00 Uhr präpariert und gemessen (siehe Abbildung 38(b)). Die Proben werden für diese Zeit gekühlt in einem Eppendorf-Behältnis aufbewahrt. Im Vergleich dazu wird ein Set (links, rechts, gemischt) direkt nach der Abnahme präpariert, eingefroren und einen Tag später gemessen (siehe Abbildung 38(a)). Dies schließt den Einflussfaktor der Alterung der Träne aus, da die Probe erst direkt vor der Messung auftaut wird.

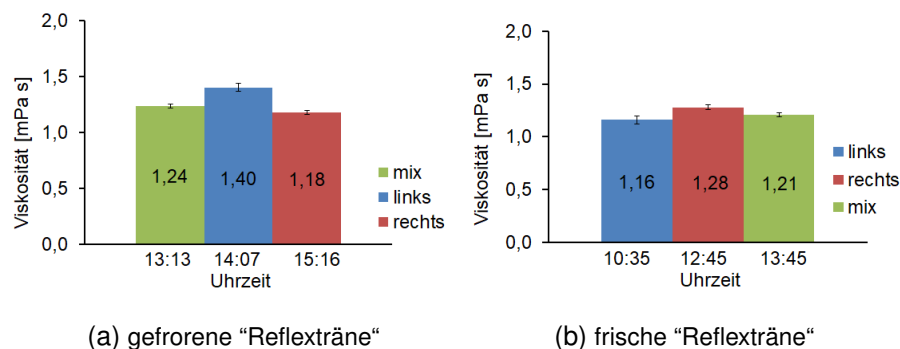


Abbildung 38: Vergleich frischer "Reflextränen" von Proband 3. Gegenübergestellt ist die Viskosität der Proben des rechten (rot), linken (blau) Auges und einer gemischten Probe (grün) in Abhängigkeit der Tageszeit. Alle Proben werden bei einer Abnahme ca. 10:35 Uhr gewonnen und halbiert. (a) fertig präparierter Satz gefroren und wieder aufgetauter "Reflextränen", die angegebenen Uhrzeiten entsprechen den Messzeiten (b) frische "Reflextränen", die zu den angegebenen Zeiten jeweils frisch präpariert und gemessen wird.

Die eben beschriebene Untersuchung wird mit drei Probanden durchgeführt, um eine bessere Interpretationsgrundlage zu schaffen.

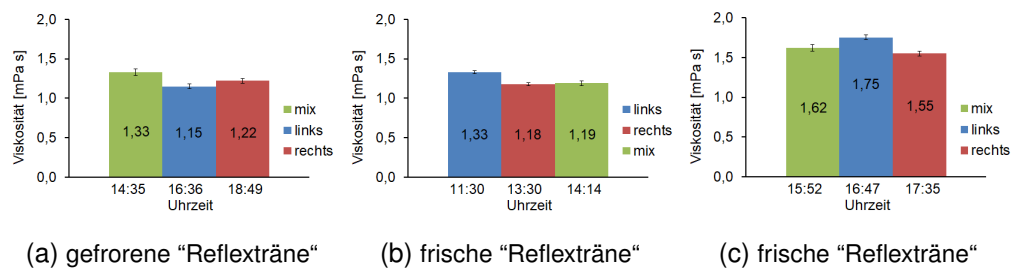


Abbildung 39: Vergleich frischer "Reflextränen" von Proband 1. Gegenübergestellt ist die Viskosität der Proben des rechten (rot), linken (blau) Auges und einer gemischten Probe (grün) in Abhängigkeit der Tageszeit. Die Proben der Messungen (a) und (b) werden bei einer Abnahme ca. 11:30 Uhr gewonnen und halbiert. (a) fertig präparierter Satz gefroren und wieder aufgetauter "Reflextränen", die angegebenen Uhrzeiten entsprechen den Messzeiten (b) frische "Reflextränen", die zu den angegebenen Zeiten jeweils frisch präpariert und gemessen werden. (c) Wiederholungsmessung von (b) an einem anderen Tag mit frischen "Reflextränen".

Proband 1 zeigt von allen Probanden die stärksten Schwankungen (siehe Abbildung 39). Die Werte verschiedener Tage unterscheiden sich erheblich. Dies kann nach eigenen Angaben wahrscheinlich auf einen unregelmäßigen und stressigen Lebensstil zurückgeführt werden. Zudem ist die Reaktion beider Augen bei jeder Abnahme unterschiedlich und damit nicht reproduzierbar. Meist trânt ein Auge stärker als das andere.

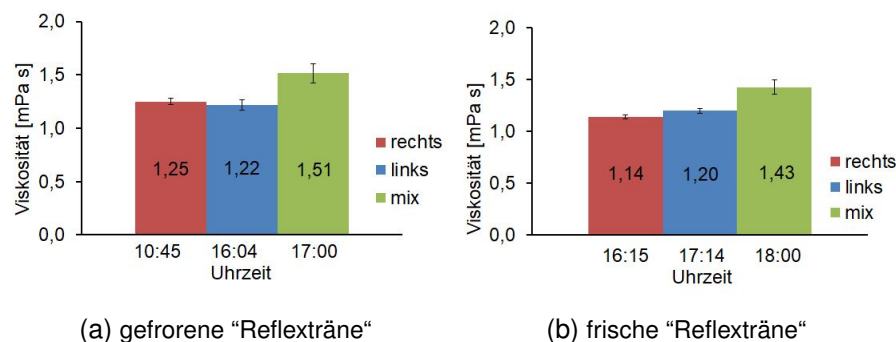


Abbildung 40: Vergleich frischer "Reflextränen" von Proband 2. Gegenübergestellt ist die Viskosität der Proben des rechten (rot), linken (blau) Auges und einer gemischten Probe (grün) in Abhängigkeit der Tageszeit. Alle Proben werden bei einer Abnahme ca. 16:15 Uhr gewonnen und halbiert. (a) fertig präparierter Satz gefroren und wieder aufgetauter "Reflextränen", die angegebenen Uhrzeiten entsprechen den Messzeiten (b) frische "Reflextränen", die zu den angegebenen Zeiten jeweils frisch präpariert und gemessen werden.

Proband 2 zeigt sich vor allem bei der Probenabnahme als relativ schwierig, da deutlich mehr Zeit benötigt wird als bei allen anderen Probanden. Nach eigenen Angaben des Probanden kann dies an einer sehr geringen Flüssigkeitszunahme liegen. Auffällig ist

wieder die erhöhte Viskosität der Mix-Proben im Vergleich zu den Einzel-Proben (siehe Abbildung 40). Diese Abweichungen kann jedoch bei allen Probanden auf den in Kapitel 4.2.1 ermittelten relativen Messfehler von 5 % zurück geführt werden.

Langzeitmessung

Die zeitliche Veränderung der Viskosität wird mit beiden Frame-Arten getestet und mehrere Male wiederholt. Untersucht wird, ob das größere Volumen innerhalb des Gene-Frames eine Kondensatbildung, verbunden mit einer Konzentrationsänderung der Träne, ermöglicht. Dies kann eine mögliche Fehlerursache und ebenfalls ein Einflussfaktor des Stoppens der Beadbewegung sein.

Zunächst werden die Proben beider Frames mit Hilfe einer Kamera im Hellfeld für eine Stunde gefilmt. Abbildung 41(b) zeigt eine Änderung der Träne im Durchmesser um $5,5 \mu\text{m}$. Das Kondensat bildete sich direkt nach dem Verschließen der Probe mit dem Deckglas. Die Bilder lassen ein Verdichten des Kondensates und eine Veränderung der Blasen am Rande des Tränentropfens erkennen.

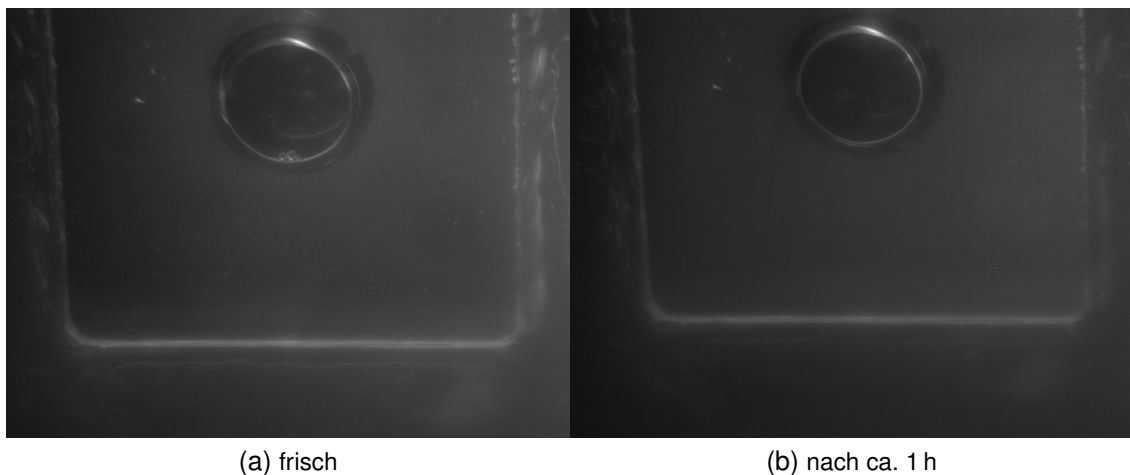


Abbildung 41: Aufnahme einer frisch präparierten Tränen-Probe im großen Frame. Untersucht wird die Kondensatbildung im Volumen um die Träne und die Veränderung des Tränentropfen und dessen Durchmesser (a) direkt nach der Präparation, (b) eine Stunde nach der Präparation.

Im Gegensatz dazu lässt Abbildung 42 keine Veränderung des Tränendurchmessers, da nahezu das gesamte Framevolumen ($2,2 \mu\text{l}$) mit $2,0 \mu\text{l}$ Träne ausgefüllt ist. Lediglich eine Umstrukturierung der Blasen ist zu erkennen.

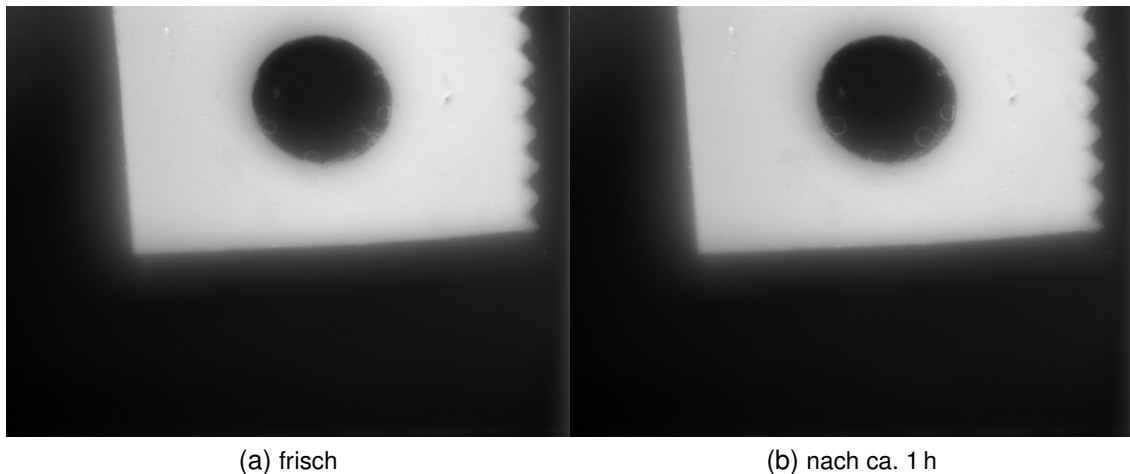


Abbildung 42: Aufnahme einer frisch präparierten Tränen-Probe im kleinen Frame. Untersucht wird die Veränderung der Träne. (a) direkt nach der Präparation, (b) eine Stunde nach der Präparation.

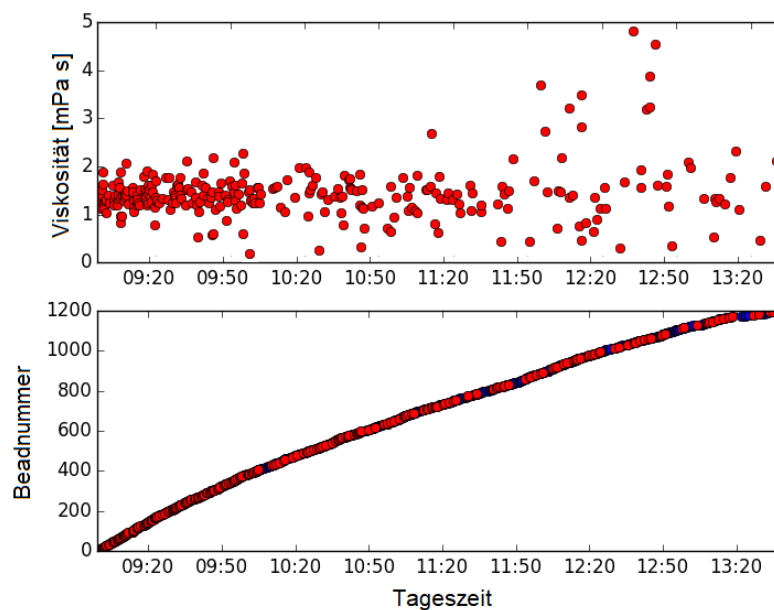


Abbildung 43: Zeitliche Veränderung der Viskosität, Langzeitmessung. Der Proben-träger wird mit einer "normalen Tränenprobe" von Proband 5 und einem großen Frame präpariert. Die Probe wird für ca. 5 h vermessen und 1200 Beads für je 1000 Zeitschritte getrackt.

Die oberen Grafiken in Abbildungen 43 und 44 zeigen die Ergebnisse beider Langzeitmessungen. Dazu wurden 1200 Beads für je 1000 Zeitschritte von Tränenproben mit beiden Frames gemessen. Dargestellt sind die geometrischen Mittelwerte der Viskositätswerte, die vom Auswertungsprogramm als korrekt gewertet und nicht aussortiert werden. Die untere Abbildung zeigt die getrackten Beadnummern in Abhängigkeit der

Zeit. Dargestellt werden die vom Auswertungsprogramm nicht gewerteten (blaue Punkte) und die gewerteten mittleren Viskositätswerte (rote Punkte) der Beads.

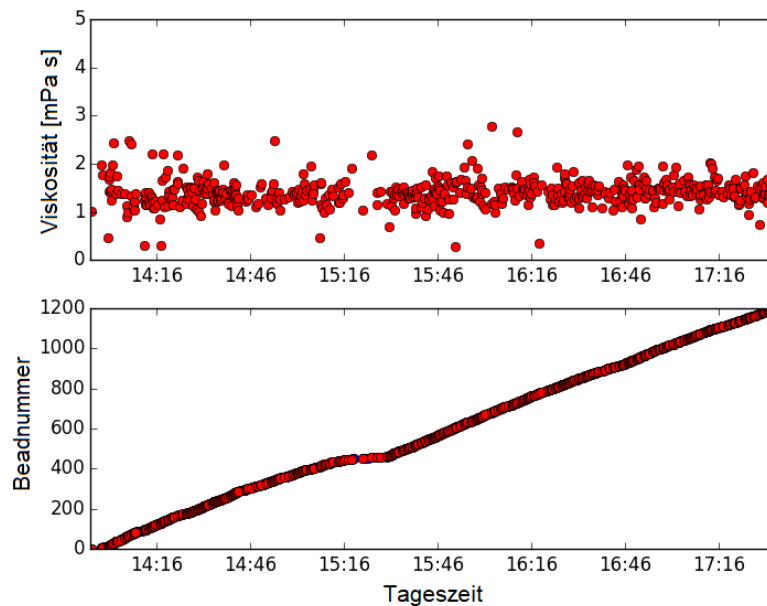


Abbildung 44: Zeitliche Veränderung der Viskosität, Langzeitmessung. Der Proben­träger wird mit einer “normalen Tränenprobe” von Proband 4 und einem kleinen Frame präpariert. Die Probe wird für ca. 4 h vermessen und 1200 Beads für je 1000 Zeitschritte getrackt.

Die Messungen bezüglich der Viskosität in Abhängigkeit der Zeit ergeben bei beiden Untersuchungen keine erkennbare Viskositätsänderung. Die mittleren Viskositätswerte der einzelnen Beads bewegen sich auch nach vier Stunden noch um den Wert $1,32 \pm 0,04$ mPa s (Abbildung 43) und $1,38 \pm 0,01$ mPa s (Abbildung 44). Die Streuung der Werte nimmt beim großen Frame zum Ende der Messung hin stärker zu. Viskositätswerte von nahezu Null würden einer unendlichen Beweglichkeit des Beads entsprechen und weisen auf einen Fehler hin. Das “ViewerTracker” Programm hat bei beiden Frames über den betrachteten Zeitraum nahezu konstante Werte aufgenommen. Die größte Pause bis zur Identifizierung des nächsten “Best Bead” dauerte ca. vier Minuten (siehe Abbildung 43 unten). Weiterhin ist zu erkennen, dass bei der Probe mit dem großen Frame nach fortgeschrittener Zeit mehr Beads vom Auswertungsprogramm aussortiert werden (blaue Punkte). Die Probe mit dem kleinen Frame weist nahezu keine aussortierten Beads auf. Es gibt ausschließlich 15:18 Uhr einen kurzen Abfall, welcher wahrscheinlich auf eine manuelle Z-Ebenen-Korrektur oder einen getrackten Beadklumpen zurück zu führen ist.

Die Messung mit dem kleinen Frame hat neben der geringeren Streuung weniger aussortierte Werte und zeigt ein gleichmäßigeres “Tracking”.

Vermutet wird, dass die Beadlösung nach dem Mischen mit der Träne mit den Tränenbestandteilen wechselwirkt und so eine Strukturänderung auslöst. Die Beads beeinflussen sich gegenseitig durch Verkleben. Ein Anstieg der Viskosität der untersuchten Träne hat darauf keinen Einfluss, da ebenso bei Proben deutlich höherer Viskosität eine Beadbewegung zu beobachten ist. Möglich ist ebenso, dass sich die Beads an entstehende Proteinstrukturen anheften.

Strukturgebende Bestandteile, sogenannte Muzine, können unter anderem den Stillstand der Fluoreszenzbeads bewirken. Sie können durch Hydroxygruppen und einem anionischen Charakter viel Wasser an sich binden und sorgen somit dafür, dass es zum Gelieren der Tränenflüssigkeit kommt. Ebenso bewirkt die Polymerisation von Proteinen eine Strukturveränderung der untersuchten Flüssigkeit. Weiterhin kann die Ansammlung der Beads innerhalb einer Ebene eine gegenseitige Beeinträchtigung dieser mit sich bringen.

Aus den bisherigen Messungen heraus zeigt sich, dass sich die kleinen Frames besser als die Gene-Frames eignen. Aus diesem Grund werden ausschließlich die kleinen Frames für folgenden Untersuchungen verwendet.

Tagesabhängigkeit

Gemessen werden "normale Tränen" von den Probanden 1-3 an je drei Tagen. Pro Tag werden mindestens fünf Proben entnommen und frisch präpariert. Die folgende Tabelle 13 und Abbildung 45(c) zeigen beispielhaft die Ergebnisse von Proband 3.

Tabelle 13: Proband 3

Messung	Viskosität [mPa s] Tag 1	Viskosität [mPa s] Tag 2	Viskosität [mPa s] Tag 3
1	1.39 ± 0.02	1.24 ± 0.02	1.57 ± 0.02
2	1.38 ± 0.03	1.60 ± 0.03	1.49 ± 0.04
3	1.34 ± 0.03	1.42 ± 0.02	1.49 ± 0.04
4	1.62 ± 0.02	1.78 ± 0.03	1.54 ± 0.02
5	1.50 ± 0.05	1.35 ± 0.04	1.47 ± 0.05
6	1.61 ± 0.03	1.28 ± 0.03	1.51 ± 0.04
Mittelwerte:	1.47 ± 0.03	1.45 ± 0.03	1.51 ± 0.03

Die Tabelle und die Diagramme in Abbildung 45 lassen deutliche Schwankungen in der Tagesform der Probanden erkennen. Proband 3 weist die konstantesten Werte auf. Nach eigenen Angaben könnte dies auf einen gesunden Schlafrhythmus und ausreichende Flüssigkeitszunahme zurück geführt werden. In den Diagrammen in Abbildung 45 sind die gemessenen mittleren Viskositätswerte pro Messung in Abhängigkeit der Tageszeit aufgetragen. Gezeigt wird der Verlauf aller drei Tage.

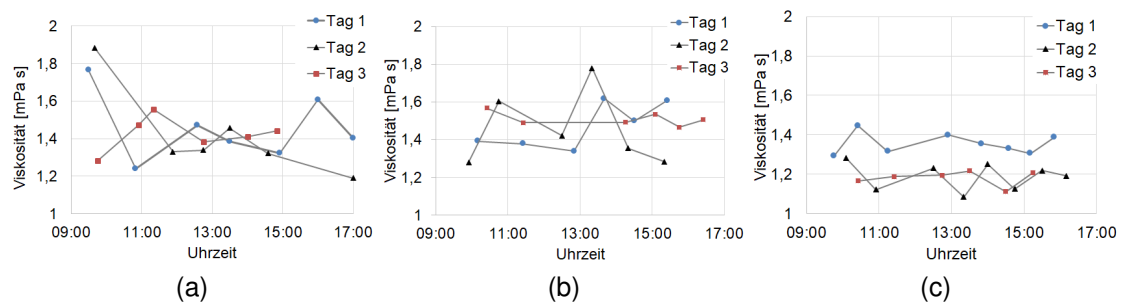


Abbildung 45: Untersuchungen der normalen Träne an drei Tagen bezüglich der Tagesabhängigkeit, (a) Proband 1, (b) Proband 2, (c) Proband 3. Aufgetragen sind die mittleren Viskositätswerte der einzelnen Messungen in Abhängigkeit der Tageszeit. Jede Messreihe (Rot, Blau, Schwarz) entspricht einem Tag.

Die Probanden 1 und 2 lassen keine konstante Einschätzung zu. Dennoch ist ersichtlich, dass Proband 1 früh, im Vergleich zum restlichen Tag, eine relativ hohe Viskosität aufweist. Dagegen zeigt Proband 2 einen leichten Anstieg in der Mittagszeit, was auf ein Mittagstief deutet. Nach Befragung der Probanden ist aufgefallen, dass Proband 1 und 2 im Vergleich zu Proband 3 eine unregelmäßigere Flüssigkeitszunahme haben. Proband 3 zeigt relativ konstante Werte innerhalb der einzelnen Tage. Zu beachten ist ebenso, dass alle Probanden täglich an Computerbildschirmen arbeiten und dadurch die Augen starker Belastung ausgesetzt sind.

Reproduzierbarkeit

Abschließend werden wiederholt Messungen durchgeführt um die Reproduzierbarkeit zu untersuchen. Dazu dienen "Reflexränen" von Proband 5, die einmalig 11:00 Uhr entnommen und bis zur Messung gekühlt gelagert werden. Die insgesamt sieben Proben werden jeweils frisch vor der Messung angemischt und mit dem kleinen Frame präpariert (siehe Abbildung 46).

Tabelle 14: Reflexräne Proband 5

Messung	Tageszeit	Viskosität [mPa s]
1	11:00	1.36 ± 0.05
2	14:25	1.51 ± 0.03
3	15:15	1.29 ± 0.02
4	16:15	1.37 ± 0.03
5	17:00	1.61 ± 0.09
6	17:45	1.54 ± 0.05
7	18:30	1.82 ± 0.04
Mittelwert:		1.50 ± 0.18

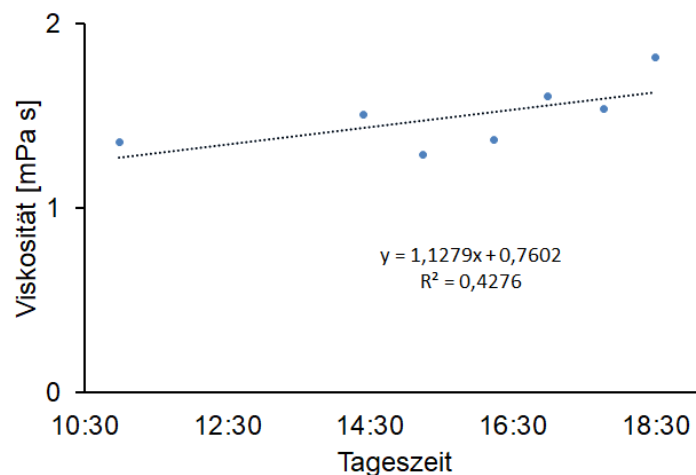


Abbildung 46: Aufgetragen sind die Viskositätswerte von sieben Messungen geplottet gegen die Tageszeit. Vermessen wurden gekühlt gelagerte und separat angemischte "Reflextränen" von Proband 5.

Die Messung ergab einen Mittelwert von 1,50 mPa s und einen Fehler von 12 % (siehe Tabelle 14). Der relative Standardfehler der einzelnen Messwerte ist < 5 %. Die Messergebnisse sind statistisch signifikant unterschiedlich und die Fehler können ebenfalls auf die Präparation zurückgeführt werden. Zudem ist nicht gewährleistet, dass die Träne an jeder Stelle innerhalb der Probe die gleiche Beschaffenheit aufweist.

4.5 Zusammenfassende Diskussion

Ziel der Arbeit war die Implementierung einer Möglichkeit zur Messung mikrorheologischer Eigenschaften von Flüssigkeiten. Die Hauptanwendung liegt vor allem im medizinischen Bereich zur Untersuchung von biologischen Proben geringer Volumina im μl Bereich. Das dazu verwendete High-Speed-Fluoreszenz-Videomikroskop ist ein Eigenbau, der aus vorangegangene Abschlussarbeit [2] stammt. Neben Weiterentwicklungen am Aufbau wurden alle Komponenten neu justiert bzw. eingerichtet. Die Ansteuerung erfolgt über Programme, die in Python geschrieben wurden. Der Messaufbau wurde gezielt für die Messung der Viskosität kleiner Flüssigkeitsmengen gestaltet. Dabei ermöglicht ein Anmischen der Proben mit fluoreszierenden Beads die Beobachtung der Brownschen Molekularbewegung und damit ein indirektes Bestimmen der Viskosität. Getestet wurde das High-Speed-Fluoreszenz-Videomikroskop zunächst mit Wasser, um die Messgenauigkeit zu überprüfen. Die anschließenden Untersuchungen erfolgten, in Zusammenarbeit mit einer medizinischen Doktorarbeit (Frau Martina Braun), hauptsächlich mit Tränenflüssigkeit. Die Arbeit wird unterteilt in die technische Umsetzung der Messung und die medizinischen Untersuchungen von Tränenflüssigkeit.

4.5.1 Messaufbau und Messgenauigkeit

Der Messaufbau wurde im ersten Schritt hinsichtlich seiner Sicherheitsaspekte verbessert. Der Objektstisch wurde mit einer Kammer aus schwarzen und nicht reflektierenden Schaumstoffplatten umhaust. Ein zusätzlicher Schutz des Bedieners vor Streustrahlung wurde durch eine absorbierende Stoffbahn erzielt. Zudem gewährleistet eine Neujustage aller optischen Komponenten des Strahlengangs eine optimale Strahlenform und -führung. Der Messaufbau ist durch seine massive Bauweise und einen schwingungsfreien Tisch, durch Drucklufthebung, unempfindlicher gegenüber Schwingungseinflüssen und Erschütterungen.

Das Herzstück des Aufbaus ist eine Hochleistungs-CMOS Kamera der Firma Andor. Zur vollständigen Anwendercharakterisierung der Kamera wurden Untersuchungen hinsichtlich der Sensitivität einzelner Pixel gegenüber der mittleren Sensitivität aller Pixel durchgeführt. Weiterhin wurden die Kameraeigenschaften bzw. Einstellungsmöglichkeiten auf Messgenauigkeit und optimale Messbedingungen abgewogen. Nach Festlegung geeigneter Kameraeigenschaften, wie beispielsweise eine schnelle Ausleserate, Wahl der Global-Shutter-Funktion und einer mittleren Kühlerstufe, wurde das System auf seine Genauigkeit zur Positionsbestimmung $1\text{ }\mu\text{m}$ großer fluoreszenter Beads untersucht. Der gemessene Fehler beträgt 2 nm - 4 nm und ist für die Viskositätsmessung von Tränenflüssigkeit ausreichend klein.

Die Untersuchungen bezüglich der Bildqualität der CMOS-Kamera ergaben ein nicht zufriedenstellendes Ergebnis. Die Kamerabilder sind durch relativ viele Hot- und Dark-Pixel gekennzeichnet. Korrekturen, wie beispielsweise das Abziehen eines Hintergrundbildes, reduzieren diese nicht vollständig.

Messungen der Intensitäten einzelner Pixel ergaben vermehrt sensitive Pixel. Diese haben ebenfalls negativen Einfluss auf die Messgenauigkeit und damit auf die Reproduzierbarkeit. Die Bewegung der fluoreszierenden Beads wird durch das statische Hintergrundmuster dieser Pixel verfälscht.

Zur Durchführung und Auswertung der Messungen wurden mehrere Python-Programme entwickelt. Das Messprogramm besteht aus einem "Tracker"- und einem "Viewer"-Teil. Der "Viewer" dient der Positionierung der Probe und der visuellen Kontrolle getrackter Beads vor und während der Messung. Die eigentliche Bestimmung der Viskosität beruht auf dem "Tracken" der $1\text{ }\mu\text{m}$ großen Beads, die der zu untersuchenden Flüssigkeit beigemischt werden. Die Beadbewegung, bedingt durch die Brownsche Molekularbewegung, wird mit einer Bildrate von ca. 471 fps anhand der Beadschwerpunktsverschiebung bestimmt. Die erhaltenen XY-Daten werden zusammen mit einem Zeitstempel, Beadnummer, Bildnummer und Bildrate in einer Textdatei gespeichert. Ein separates Auswertungsprogramm nutzt diese und erstellt eine neue Textdatei mit allen für die Bestimmung der Viskosität verwertbaren Beadbewegungen, sowie den geometrischen

Mittelwerten und den absoluten Fehler dieser Viskositätswerte. Erstellt werden zudem Diagramme, welche die Zufallsbewegung und die mittleren quadratische Verschiebung (MSD) in Abhängigkeit der Zeit zeigen. Das Auswertungsprogramm ermittelt Diagramme, die zusammen sowohl die logarithmische mittlere Beadbewegung ($\log \text{MSD}$) versus der logarithmischen Zeit ($\log t$) als auch eine lineare Fitfunktion ($\text{MSD} = a \cdot t$) an die gemessenen Daten zeigt. Die Funktion wird anhand der MSD-Werte von 3 ms - 30 ms gefittet. Zu große Abweichungen der Werte vom Fit werden durch das Bestimmtheitsmaß $R^2 < 0,9$ nicht mehr gewertet. Dies gewährleistet, dass zusammen geklebte oder gestoppte Beads mit beeinträchtigter Bewegung nicht mit einbezogen werden.

Die Reproduzierbarkeit wurde zunächst mit Hilfe von Wasser untersucht. Der Literaturwert der Viskosität von Wasser beträgt bei einer Raumtemperatur von 25 °C 0,89 mPa s (siehe Kapitel 3.3.2). Die Messwerte ergaben einen Mittelwert von 0,90 mPa s mit einem relativen Fehler von 5 % (siehe Abbildungen 30 und Tabelle 8). Unter Berücksichtigung des Messfehlers ist die Reproduzierbarkeit ausreichend genau, um die Untersuchung von biologischen Proben zu ermöglichen. Die Messung der "Reflextränen" eines Probanden ergab einen Mittelwert von 1,5 mPa s und eine Unsicherheit von 12 %. Unterschiede in der Messgenauigkeit wurden ebenfalls bei Messungen von synthetischen Tränen festgestellt. Die Messungen der Augentropfen-Proben von Cartionorm (siehe Abbildung 31) ergaben einen Gesamtfehler von 17 %, obwohl der Viskositätswert ähnlich dem von Wasser bei ca. 1,1 mPa s liegt. Der viel höhere Fehler kann auf die milchige Flüssigkeit zurück geführt werden, da diese das emittierte Licht stärker streut und dadurch für weniger Kontrast bei der Bildgebung sorgt. Flüssigkeiten mit hoher Viskosität, wie beispielsweise die betrachteten Bepanten-Augentropfen, lassen sich gut vermessen (siehe Abbildung 33). Die Viskosität konnte mit einem Mittelwert von 10,5 mPa s und einem Gesamt Fehler von 7 % bestimmt werden. Im Gegensatz zu Wasser hat hier die Präparation bzw. die Anmischung der Beads einen größeren Einfluss als bei Flüssigkeiten kleinerer Viskosität. Die Beads befinden sich in einer wässrigen Lösung, die bei Zugabe der Beadlösung die Probenflüssigkeit geringfügig verdünnt und somit verfälscht. Zudem ist keine homogene Verteilung der Flüssigkeit und ihrer Bestandteile gewährleistet.

Die Art der Präparation spielt eine große Rolle. Aus diesem Grund wurde ein Protokoll (siehe Anhang), im Zuge der bereits erwähnten medizinischen Doktorarbeit, mit expliziten Anweisungen speziell für Wasser- und Tränen-Proben erstellt. Die Pipettierung der μl Volumina gestaltet sich relativ schwierig und bedarf Übung. Die Zugabe von 0,2 μl Beadlösung muss sehr sorgfältig geschehen, da die Konzentration der Beads nicht zu klein bzw. zu groß gewählt werden darf. Eine zu große Konzentration hat, wie das Schwerkraft-bedingte Absinken, eine gegenseitige Beeinflussung der Beads zur Folge (siehe Abbildung 22 (c)).

Diese Faktoren, d.h. das gegenseitige Beeinflussen, das Absinken der Beads und das damit verbundene Stoppen der Bead-Bewegung wurde in den Langzeitmessungen un-

tersucht. Messungen frischer Proben für längere Zeit (ca. 3 h - 5 h) ergaben eine größere Streuung der Messwerte mit voranschreitender Zeit (siehe Abbildung 43). Als Ursache wird eine Kondensatbildung innerhalb der Gene-Frame-Probenkammer vermutet (siehe Abbildung 41). Dies führt zu einer Konzentrations- bzw. Proteinänderung der Träne. Ein Lösungsansatz ist die Entwicklung eines kleinen Frames (siehe Abbildung 42). Die Langzeitmessungen mit diesen kleinen Frames ergaben deutlich weniger Streuung und kaum fehlerhafte Werte (siehe Abbildung 44).

4.5.2 Tränenflüssigkeit

Nach der Kalibrierung des Hochgeschwindigkeits-Fluoreszenz-Videomikroskops mit Hilfe von Wasser wurden hauptsächlich biologische Proben, d.h. Tränenflüssigkeit und vergleichbare medizinische Materialien untersucht. Alle bisher betrachteten Proben konnten ohne weiteres in den geforderten Volumina von $2\ \mu\text{l}$ mit Fluoreszenzbeads angereichert und gemessen werden. Im späteren Verlauf der Arbeit ermöglichten selbst entwickelte Frames die Untersuchung von $2\ \mu\text{l}$ Flüssigkeit ohne Kondensatbildung, die wie bereits beschrieben zu einer Konzentrations- bzw. Strukturveränderung der Träne und damit zu verfälschten Messergebnissen führen kann.

Beobachtet wurde, dass die Probenpräparation und die Aufbewahrung einen großen Einfluss auf die Träne hat. Nach Anreicherung der Flüssigkeit mit den Fluoreszenzbeads kann die Probe nur temporär genutzt werden, da es nach kurzer Zeit, ca. 5 Stunden, beim Großteil der Beads zum Stoppen der Brownschen Molekularbewegung kommt. Als Ursache wird eine Polymerisation der in der Tränenflüssigkeit vorhandenen Muzine eine Strukturveränderung bzw. ein Gelieren der Träne vermutet. Die Verwendung des selbst entwickelten kleinen Frames ermöglicht ein deutlich kleineres Volumen von $2,2\ \mu\text{l}$. Die dadurch verhinderte Kondensatbildung verlangsamt die Strukturänderung der Flüssigkeit und verlängert somit die Verwendungszeit der Träne.

Zudem hat die Art der Lagerung der Träne einen Einfluss auf die Viskosität. Ein Einfrieren der fertig präparierten Probe erwies sich als gute Methode, da sich die Viskosität im Vergleich zur frisch entnommenen Träne kaum unterscheidet (siehe Tabelle 11). Nachteil hierbei war die Messdauer, die sich nach dem Auftauen durch teilweise verklumpte Beads verlängerte. Gefrorene Proben können problemlos nach mehreren Tagen aufgetaut und trotz verlängerter Messzeit vermessen werden. Zudem wirkt ein Vortexen der aufgetauten Proben dem Verklumpen der Beads etwas entgegen. Weiterhin verlängert ein Lagern der Tränenflüssigkeit auf Eis die Zeit der Verwendbarkeit auf bis zu 12 h. Eine konstante Viskosität ist allerdings nur dann gegeben, wenn die Träne aus der Kapillare unmittelbar nach deren Entnahme in ein Eppendorf-Behältnis gegeben wird. Das Aufbewahren der nicht mit Beads angereicherten Probe in der Glas-Kapillare führte dagegen in Vergleichsmessungen zum Sinken der Viskosität (siehe Tabelle 12). Als Ursache dafür wird eine durch Proteinabsorption an der Glaskapillare bedingte Konzen-

trationsänderung angenommen. Die Träne wird dadurch verdünnt, d.h. die Viskosität sinkt. Die besten Ergebnisse werden mit frisch entnommenen, angemischten und direkt vermessenen Tränenproben erzielt. Falls die Messung im Labor innerhalb eines Tages nach der Tränenentnahme erfolgt, wäre die geeignetste Lösung, dass Kühlen der Träne in einem Eppendorf-Behälter durch Eiswasser. Um längere Zeiten zu überbrücken, muss die Probe fertig präpariert auf dem Probenträger direkt eingefroren werden.

Die anfängliche These, dass die "normale Träne" im Vergleich zur "Reflexträne" anhand ihrer Viskosität aussagekräftiger ist, konnte weder bestätigt noch ausgeschlossen werden (siehe Abbildungen 36 und 40). Die Schwankungen der Messergebnisse sind bei beiden Tränensorten zu stark probanden- und tagesformabhängig. Einflussfaktoren wie Flüssigkeitsaufnahme, Ernährung und Schlaf können das Ergebnis beeinflussen. Selbst innerhalb eines Tages ließen Versuchsreihen von insgesamt drei Probanden kaum Interpretationsmöglichkeiten zu (siehe Abbildung 45). Zudem konnte teilweise eine unterschiedliche Viskosität zwischen beiden Augen des selben Probanden gemessen werden. Ebenso wurde ein Anstieg der Viskosität einer gemischten Probe aus beiden Augen im Vergleich zu den einzelnen Augen beobachtet (siehe Abbildung 40).

Vorteile der "normalen Träne" gegenüber der "Reflexträne" ist, dass das Auge nicht gereizt werden muss. Die Träne kann jederzeit problemlos ohne Irritation des Auges entnommen werden. Nachteilig für die Präparation ist hingegen die geringe Probenmenge von 2 μ l (pro Kapillare).

5 Zusammenfassung und Ausblick

Diese Arbeit befasst sich mit der Implementierung einer Methode zur Viskositätsmessung von kleinsten Flüssigkeitsmengen. In Zusammenarbeit mit einer Medizin-Studentin (Frau Martina Braun) wurde eine Methode zur Untersuchung biologischer Proben, insbesondere Tränenflüssigkeiten von Patienten, die unter dem sog. Trockenen Auge-Syndrom leiden, eingesetzt.

Das "trockene Auge" ist eine Erkrankung mit facettenreichen Symptomen, wobei meist eine Reizung des Auges bzw. eine Entzündung auftritt. Ausgelöst wird das trockene Auge durch ein vorzeitiges Abreißen des Tränenfilms, wobei die Ursachen dafür wiederum in einer zu geringen Flüssigkeitsmenge, einer zu geringen Viskosität oder einer zu hohen Oberflächenspannung liegen können. Um eine genauere Diagnose stellen zu können, soll der Einfluss des trockenen Auge-Syndroms auf die Viskosität der Tränenflüssigkeit von Patienten untersucht werden. Ein bisher ungelöstes Problem liegt dabei im geringen Probenvolumen von wenigen Mikrolitern, welches aufgrund von Verdunstung außerdem nur über einen kurzen Zeitraum vermessen werden kann. Bisherige Bestimmungsmöglichkeiten der Viskosität, etwa mittels Plattenrheometer oder Fallkörperviskosimeter, benötigen ein weitaus größeres Probenvolumen von $> 100 \mu\text{l}$, welches bei der Tränenflüssigkeit nicht zur Verfügung steht. In dieser Arbeit wurde deshalb ein Verfahren entwickelt, welches die Möglichkeit einer Untersuchung von Volumina im geforderten μl Bereich bietet. Die Grundidee des Verfahrens bestand darin, durch Beimischen von fluoreszenten Beads in die Tränenflüssigkeit die "Brownsche Molekularbewegung" der Teilchen mittels Hochgeschwindigkeits-Fluoreszenz-Videomikroskopie auszuwerten. Eine Software ermöglicht automatisch das Verfolgen bzw. "Tracken" des Masseschwerpunktes der $1 \mu\text{m}$ großen Fluoreszenzbeads über die Zeit. Durch die Beadtrajektorien kann die Viskosität der Flüssigkeit anhand der Stokes-Einsteinschen Beziehung für die Brownsche Molekularbewegung berechnet werden.

In dieser Arbeit wird der optische Messaufbau sowie die Implementierung der Software beschrieben. Die Software besteht aus einem "Echtzeittracking" mit gleichzeitiger visueller Verfolgung der Beads, dem "Viewer". Aus den Beadtrajektorien wird anschließend mit Hilfe eines offline-Auswerteprogramms, welches nicht Bestandteil dieser Arbeit ist, die Viskosität der umgebenden Flüssigkeit berechnet. Neben dem Erstellen der Programme zur Datenakquisition, der umfangreichen Charakterisierung der Hochgeschwindigkeits-Videokamera, dem optimalen Einrichten der optischen Elemente und der Probenpräparation, standen die Messungen von Kalibrationsflüssigkeiten und Tränenproben von Probanden zur Bestimmung der Messgenauigkeit und Reproduzierbarkeit im Vordergrund.

Gezeigt werden konnte, dass der Versuchsaufbau Messungen medizinischer Proben mit nur $2 \mu\text{l}$ ermöglicht. Die Unsicherheit bei der Bestimmung der Viskositäten verschiedener Flüssigkeiten konnte nach systematischer Beseitigung von diversen Fehlerquellen und Einflussfaktoren wie Präparation, Alterung und Temperatur auf $< 5\%$ (bei Wasser)

bzw. 9 % (bei synthetischer Tränenflüssigkeit) reduziert werden. Im Vergleich dazu ist die Variabilität der Viskosität realer Tränenproben zwischen Probanden deutlich höher, so dass sich das hier entwickelte Verfahren für die Viskositätsbestimmung von Tränenflüssigkeit eignet. Damit steht erstmals eine Methode zur Verfügung, die es klinischen Forschern erlaubt, den Einfluss der Tränenviskosität auf das Trockene Auge-Syndrom systematisch zu untersuchen.

Für die Verbesserung zukünftiger Untersuchungen muss beispielsweise eine Kamera mit besserer Rauschcharakteristik in Betracht gezogen werden. Weitere technische Einflüsse auf die Messungengenauigkeit liegen beispielsweise beim mehrmaligen "Tracken" des selben Beads. Dies hat negativen Einfluss auf die statistische Aussage, da nicht alle Beads eine perfekte Beschaffenheit haben. Derzeit ist das mehrmalige Tracken nicht vermeidbar und müsste zukünftig vom Messprogramm erkannt und unterbunden werden. Ebenso sollte das Programm dahingehend angepasst werden, dass ein Messen von verklebten oder stillstehenden Beads im Vorfeld abgebrochen wird. Ebenfalls ist aufgefallen, dass zwei verklebte Beads nicht vom Programm als ungeeignet erkannt werden, wenn sie sich direkt übereinander befinden. Die dadurch beeinträchtigte Bewegung wird in diesem Fall getrackt und kann die Werte verfälschen.

Der höhere Messfehler der Tränenflüssigkeit gegenüber Wasser wird in der Inhomogenität der Träne, der variablen Zumischung der Trägerflüssigkeit für die Beads sowie in der zeitlichen Veränderungen der Tränenflüssigkeit (Mucin-Polymerisation, Protein-Absorption an der Gefäßwand) vermutet. Die tageszeitlichen Schwankungen der Viskosität von Tränen sowie die relativen Unterschiede zwischen Probanden übersteigen die Messunsicherheit von 12 % allerdings deutlich, so dass diesbezüglich der medizinischen Interpretation der Messergebnisse noch weitere Untersuchungen notwendig sind.

Danksagung

Zunächst möchte ich mich an dieser Stelle bei all denjenigen bedanken, die mich während der Anfertigung dieser Masterarbeit unterstützt und motiviert haben. Ganz besonderer Dank gilt meinen Betreuer Prof. Dr. Ben Fabry, der mich in meiner Zeit am Zentrum für Medizinische Physik und Technik der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg betreut und mich bei Erklärungsbedarf unterstützt hat. Daneben gilt mein Dank Prof. Dr. Alexander Horn, der mich trotz großer Entfernung von Seitens der Hochschule Mittweida aus betreute. Erwähnen möchte ich auch meine Eltern, alle Freunde und Kollegen, die mich moralisch unterstützten, immer motiviert und einen großen Teil zur Vollendung beigetragen haben.

Danke

Literaturverzeichnis

- [1] Andor. Spezifikation Neo sCMOS Kamera, 2017.
- [2] Christopher Burger. *Implementierung eines Verfahrens der Super-Resolution-Mikroskopie und Untersuchung der Ultrastruktur des Aktin-Zytoskeletts von Tumorzellen*. PhD thesis, Hochschule Coburg, 2013.
- [3] CNI. Datenblatt, Laser (MGL-H-532), 2017.
- [4] Peter Eppich. Möglichkeiten der Rauschreduzierung bei modernen DSLR-Kameras. Seiten 1–8.
- [5] Ben Fabry. Entstehung des Schrotrauschens bei CCD-Sensoren. *Vorlesungsunterlagen*, 0:1–7, 2017.
- [6] Ben Fabry. Function and applications of CCD-cameras CCD. *Vorlesungsunterlagen*, 2017.
- [7] Torsten Fliessbach. *Statistische Physik*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 2010.
- [8] Gerhard Holst. sCMOS – Die eierlegende Wollmilchsau der Bildsensorik? *Wiley-VCH Verlag*, Seiten 37–39, 2009.
- [9] HAMEG Instruments. Was ist Rauschen. *Fachbericht Spektrumanalyse*, 2005.
- [10] Thomas Kaercher. Das Trockene Auge – Diagnostik und Klassifikation Das Trockene Auge – Diagnostik und Klassifikation. Seiten 1–22, 2017.
- [11] Sebastian Küpper. Allgemeine Augenheilkunde. *Vorlesungsunterlage*, 2017.
- [12] Raphael Manck and Reinhard Fischer. Mikroskopie jenseits der Auflösungsgrenze. *Biologie in unserer Zeit*, 42(4):244–253, 2012.
- [13] Dieter Meschede. *Optik, Licht und Laser*. Springer Fachmedien, Wiesbaden, 2005.
- [14] Soergel Povh. *Anschauliche Physik*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 2014.
- [15] Aleksandra Radenovic. Brownian Motion and Single Particle Tracking. *Vorlesungsunterlagen*, Seiten 1–23, 2016.

- [16] Eckhard Rebhan. *Theoretische Physik: Thermodynamik und Statistik*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 2010.
- [17] Benjamin Schardt and Stephan Klemm. Verätzungen der Hornhaut – Informationen und Therapiemöglichkeiten, 2017.
- [18] Sigma-Aldrich. Datenblatt, Microcapillary tube Drummond Microcaps®, 2017.
- [19] Klaus Stierstadt. *Thermodynamik*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 2010.
- [20] Thermofisher. Datenblatt, Fluoreszenz Beads, 2017.
- [21] Universität Magdeburg. Stoffwerte - Flüssigkeiten Kritische Zustandsgrößen. *Vorlesungsunterlagen*, Seiten 2–7, 2017.
- [22] Sebastian van de Linde and Markus Sauer. dSTORM: Hochauflösende Fluoreszenzmikroskopie. *BIOforum*, 2:S. 10–12, 2010.
- [23] Ulrich Welsch and Maria Mulisch. *Mikroskopische Technik*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 2010.
- [24] Karl Zilles and Bernhard N. Tillmann. *Anatomie*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York Bibliografische, 2010.

Anhang

Ausgabe Kameraeigenschaften

```
( 'AccumulateCount', '1', (), 0.0, 0.0)
( 'AcquisitionWindow', 'Custom AOI (100x100)', ( '128x128', '512x512', '1392x1040',
'1920x1080', '2048x2048', 'Full Image'), 0.0, 0.0)
( 'AuxiliaryOutSource (TTL I/O)', 'FireAll', ('FireAll', 'FireAny', 'FireRow1', 'FireRowN'),
0.0, 0.0)
( 'Binning', '1x1', ('1x1', '2x2', '3x3', '4x4', '8x8'), 0.0, 0.0)
( 'CameraFirmware', '15.1.20.0', (), 0.0, 0.0)
( 'CameraID', 'SCC-02643', (), 0.0, 0.0)
( 'CameraModel', 'NEO-5.5-CL3', (), 0.0, 0.0)
( 'CameraName', 'Neo 5.5 CL 3 Tap', (), 0.0, 0.0)
( 'CurrentSoftware', '3.13.30001.0', (), 0.0, 0.0)
( 'Description', 'SDK3 Device Adapter for sCMOS cameras', (), 0.0, 0.0)
( 'ElectronicShutteringMode', 'Global', ('Global', 'Rolling'), 0.0, 0.0)
( 'Exposure', '0.9979', (), 0.0, 0.0)
( 'Ext (Exp) Trigger Timeout[ms]', '5000', (), 0.0, 0.0)
( 'FanSpeed', 'On', ('Low', 'Off', 'On'), 0.0, 0.0)
( 'FrameRate', '22.6521', (), 0.0, 0.0)
( 'FrameRateLimits', 'Min: 0.00005 Max: 478.90136 Max Sustain: 1157.40741', (), 0.0,
0.0)
( 'LightScanPlus-ExposedPixelHeight', '108', (), 0.0, 0.0)
( 'LightScanPlus-ExternalTriggerDelay [s]', '0.0000', (), 0.0, 0.0)
( 'LightScanPlus-LineScanSpeed [lines/sec]', '108231.7073', (), 0.0, 0.0)
( 'LightScanPlus-RowReadTime', '0.0000', (), 0.0, 0.0)
( 'Overlap', 'Off', ('Off', 'On'), 0.0, 0.0)
( 'PixelEncoding', 'Mono12', ('Mono12', 'Mono12Packed', 'Mono16', 'Mono32'), 0.0, 0.0)
( 'PixelReadoutRate', '560 MHz - fastest readout', ('200 MHz - lowest noise', '560 MHz -
fastest readout'), 0.0, 0.0)
( 'Sensitivity/DynamicRange', '12-bit (low noise)', ('12-bit (high well capacity)', '12-bit (low
noise)', '16-bit (low noise and high well capacity)'), 0.0, 0.0)
( 'SensorCooling', 'On', ('Off', 'On'), 0.0, 0.0)
( 'SensorTemperature', '-17.4800', (), 0.0, 0.0)
( 'ShutterTransferTime [s]', '0.0000', (), 0.0, 0.0)
( 'SpuriousNoiseFilter', 'On', ('Off', 'On'), 0.0, 0.0)
( 'StaticBlemishCorrection', 'On', ('Off', 'On'), 0.0, 0.0)
( 'TemperatureControl', '-30.00', ('-15.00', '-20.00', '-25.00', '-30.00', '-35.00', '-40.00'),
0.0, 0.0)
```

('TemperatureStatus', 'Cooling', ('Cooler Off', 'Cooling', 'Drift', 'Fault', 'Not Stabilised', 'Stabilised'), 0.0, 0.0)

('TransposeCorrection', '0', ('0', '1'), 0.0, 0.0)

('TransposeMirrorX', '0', ('0', '1'), 0.0, 0.0)

('TransposeMirrorY', '0', ('0', '1'), 0.0, 0.0)

('TransposeXY', '0', ('0', '1'), 0.0, 0.0)

TriggerMode 'Internal (Recommended for fast acquisitions)', ('External', 'External Exposure', 'External Start', 'Internal (Recommended for fast acquisitions)', 'Software (Recommended for Live Mode)'), 0.0, 0.0)

Materialvorbereitung zur Viskositätsmessung:

Benötigt wird:

- Beads (Invitrogen F8820/ FluoSpheres carboxylate-modified, 1,0 µm orange)
- Aqua bidest
- 0,5 ml und 1,5 ml Eppis
- 1-/10-/100- und 1000 µl- Pipette
- Gene Frames (Fisher Scientific AB-0576)/ Kleiner Frame (K-Frame)
- Deckgläser (quadratisch oder rund)
- Objektträger
- Doppelseitiges Klebenband

Stammlösung vorbereiten:

- 50µl Beads
- 3x in 1000 µl H²O waschen
- 7000 rpm; 4°C; 5 min
- Die Überstände vorsichtig abnehmen
- Beads in 500 µl H²O resuspendieren
- 15 Sekunden sonifizieren

Bevor die Beads zu den Proben pipettiert werden, Beads sonifizieren bzw. Vortexen.

H²O- Probe vorbereiten:

- In einem 1,5 ml Eppi 9,5 µl H²O vorlegen und 0,5 µl gevortexte Beads zugeben
- Gut resuspendieren
- Geneframe mittig auf einen Objektträger kleben
- 10 µl H²O/Beads mittig in das Frame geben und
- Vorsichtig ein Deckglas auflegen und an den Rändern mit einer Pipette glattstreichen.

Tränenprobe vorbereiten:

- 4 µl Tränenflüssigkeit in den Deckel eines 0,5 ml Eppis geben
- 0,2 µl Beads dazu geben
- Mit der Pipette durch mehrmaliges Aufziehen Beads mit Tränenflüssigkeit mischen

➤ Großer Frame (Geneframe):

- Geneframe mittig auf einen Objektträger kleben
- 4,2 µl Träne/Beads mittig in das Frame geben und
- Vorsichtig ein Deckglas auflegen und an den Rändern mit einer Pipette glattstreichen.

➤ Kleiner Frame (K-Frame):

- K-Frame mittig auf einen Objektträger kleben
- 2 µl Träne/Beads mittig in das Frame geben und
- Vorsichtig ein rundes Deckglas auflegen und an den Rändern mit einer Pipette glattstreichen.

K-Frame Herstellung:

- Ausschneiden von ca. 1x1 cm Quadraten aus handelsüblichem doppelseitigem Klebeband
- Mittig des Quadrates ein 4 mm Loch stanzen (Biopsiepunch 4 mm)

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich meine Arbeit selbstständig verfasst, keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die Arbeit noch nicht anderweitig für Prüfungszwecke vorgelegt habe.

Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus Quellen entnommen wurden, sind als solche kenntlich gemacht.

Mittweida, 28.09.2017